

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
ZOOLOOGIA ÕPPETOOL

Martin Pent

**VILASKTOMPLOOMADE
(*DICYEMIDA*) FÜLOGENEES**

Magistritöö

Juhendaja: Ph.D. Marko Prous

TARTU 2014

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	3
2. Kirjanduse ülevaade	4
2.1. Vaheloomad (<i>Mesozoa</i>).....	4
2.2. Klass vöötomploomad (<i>Orthonectida</i>).....	7
2.3. Klass vilasktomploomad (<i>Dicyemida</i>)	8
2.4. Senised fülogeneetilised hüpoteesid.....	11
2.5. Töö eesmärgid	14
3. Materjalid ja metoodika	15
3.1. Andmestiku kogumine.....	15
3.2. Joonduste koostamine ja puude konstrueerimine	17
3.3. Fülogeneetiliste analüüside mudelid	17
3.3.1. Le ja Gascuel' (LG) mudel	17
3.3.2. LG4X ja LG4M – nelja maatriksiga mudelid.....	18
3.3.3. Struktuuripõhised – ja segamudelid.....	19
4. Tulemused	20
5. Arutelu.....	25
Kokkuvõte	28
Summary	30
Tänuavaldused.....	31
Kasutatud materjalid	32
LISAD	36

1. Sissejuhatus

Vilasktomploomad (*Dicyemida*) on väikesed mereselgrootutes, enamasti kaheksajalgades elutsevad parasiidid (Stunkard 1954; Katayama *et al.* 1995; Furuya & Tsuneki 2003; Suzuki *et al.* 2010). Taksonoomilise kuuluvuse osas paigutatakse need parasiidid traditsiooniliselt ühte rühma koos sarnaste lihtsa ehitusega parasiitide võõrtomploomadega (*Orthonectida*), kes koos moodustavad vaheloomade (*Mesozoa*) rühma, kuid juba pikemat aega on teadlastele peavalu valmistanud selle loomarühma paiknemine üldises elupuus. Juba möödunud sajandi keskpaigas kerkisid esile vaidlused teemal, kas vilasktomploomade ja üldiselt vaheloomade näol on tegemist evolutsioonilise vahevormiga ainuraksete protistide ja hulkraksete loomade vahel või on tegemist hoopis ekstreemse näitega sellest, missuguse taandarengu võib organism läbi teha parasitismi tulemusena ning et tegelikult kuuluvad vilasktomploomade esivanemad hoopis lameusside (Slyusarev & Kristensen 2003) või veelgi keerukama ehitusega organismide nagu limuste või rõngusside hulka. Ja kuigi uuemad molekulaarsete andmestike põhjal läbi viidud fülogeneetilised uuringud toetavad nende parasiitide kuuluvust hulkraksete loomade (*Metazoa*) hulka – nende kehaehituski koosneb kümnest kuni neljakümnest rakust (Suzuki *et al.* 2010) –, esineb nende täpsema päritolu kohta endiselt mitmeid hüpoteese, mis pahatihti on üksteisega vastuolus. Samuti näivad fülogeneetilistele analüüsidele vastu rääkivat mõned uuemad morfoloogilised uuringud, mille põhjal tundub nende evolutsioon äärmusliku degeneratsiooni tulemusena vaieldav (Czaker 2011).

Olgugi, et ühegi vilasktomploomade hulka kuuluva liigi, keda praeguseks on kirjeldatud juba üle saja, genoom pole tänaseks päevaks sekveneeritud, on tänu viimasel ajal ilmunud teadustöödele (Ogino *et al.* 2007, 2010; Suzuki *et al.* 2010) lisandunud palju uut informatsiooni nende omapäraste organismide geneetilise materjali kohta. Samal ajal on bioinformaatika valdkonnas jätkunud üha paremate fülogeneesi meetodite väljatöötamine. Ükski nendest pole mõistagi täiuslik ning ilmselt jääb fülogenees mahukaks uurimisvaldkonnaks nii bioloogidele kui arvutiteadlastele veel väga pikaks ajaks (Rannala & Yang 2008). Küll on aga alust avata, et uuemad, varasematest rohkemaid mõjufaktoreid arvesse võtvad meetodid peaksid olema suutelised organismide vahelisi põlvnemissuhteid taastama järjest suureneva realistlikkusega.

W. Maddison (1997) soovitas fülogeneesipuid tõlgendada mitte kui ajalugu sellest, mis kunagi juhtus, vaid kui ajalugu sellest, mis võis juhtuda. Tema ei uskunud, et

fülogeneesi rekonstrueerimisel molekulaarsete tunnuste põhjal saab rääkida sellest, kuidas mõni üksiku geeni põhjal koostatud fülogeneesipuu kas toetab või räägib vastu paljude geenide põhjal saadud liigipuule. Võib-olla on neil kõigil õigus ning fülogeneesi kui sellist tuleks kujutleda pigem kui kõikide üksikgeenide evolutsiooni kogusummana kujunenud statistilist tõenäosusjaotust, mitte kui diskreetseid jooni, mis ühendavad erinevaid liike elupuus. Teisalt, isegi kui fülogeneesipuu pole enam kui hüpotees, mida lõplikult kinnitada ega ümber lükata pole võimalik ning ka täpset geenide ja liikide lahknemise ajalugu ei saa detailideni kirjeldada, ei ole valdkonna tähtsus kunagi küsimärgi alla sattunud. Juhul, kui vilasktomploomad esindaksid vahepealset ehitusplaani ainuraksete protistide ja hulkraksete loomade vahel, loodeti see olevat ülioluline teetähis arengubioloogia seisukohast (Stunkard 1954). Ajapikku on nimetatud probleemi käsitlevate teadustööde hulk küll kasvanud, kuid ammendav, kõiki osapooli rahuldav vastus on sellegipoolest saamata jäänud.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Vaheloomad (*Mesozoa*)

Vaheloomad (*Mesozoa*) on üks kõige mõistatuslikumaid teadaolevaid loomarühmi. Vähe on teada nende evolutsioonilisest ajaloost ning kaheldud on ka rühma homogeensuses (Pawlowski *et al.* 1996). Täpne liikide arv on teadmata, kui hetkel tuntakse üle 100 liigi loomi, kelle ehitusplaani ei liigitu üheselt ei ainuraksete ega hulkraksete loomade alla ning keda sellest tulenevalt käsitletakse vaheloomade sekka kuuluvaks (Brusca & Brusca 2003). Kirjanduslikud allikad pole üksmeelel küsimuses, millal vaheloomad esimest korda teaduse jaoks registreeriti. Brusca ja Brusca (2003) järgi tehti esimesed ülestähendused vaheloomade kohta sakslase August David Krohni poolt aastal 1839, mil ta esmakordselt kirjeldas rombloomi e. vilasktomploomi. Teise teooria kohaselt kuulub vaheloomade esmakirjeldaja au itaallasele Filippo Calvolinile, kes juba 18. sajandi lõpus avastas kaheksajalgades elutsevad väikesed usjad parasiidid – vilasktomploomad.

Hiljem, aastal 1849 omistas Šveitsi teadlane Albert von K lliker neile parasiitidele praeguse ni kehtiva nime *Dicyemida*, mis oli inspireeritud t igast, et elutsükli käigus esineb neil olenditel kahte t upi embrüoid (Noto & Endoh 2004). Esimese põhjalikuma uurimuse nende elukate kohta avaldas 1876. aastal Belgia zooloog Edouard van Beneden, kus nimetas nad muuhulgas *Mesozoa*’ks ehk vaheloomadeks, kuna uskus need eluvormid olevat evolutsiooniline vahelüli *Protozoa* (protistid, algloomad) ja *Metazoa* (hulkraksed) vahel. Levinuima ja tänapäeval kõige aktsepteerituma klassifikatsiooni kohaselt kuuluvad vaheloomade hõimkonda kaks klassi, rombloomad (*Rhombozoa*, mõnedes tekstides ka *Dicyemida*) ja v  ttomploomad (*Orthonectida*), mõlemad rühmad on moodustunud ussiladsetest parasiitidest või s mbiontidest, kes nugivad erinevatel mereselgrootutel, näiteks hulkharjas – ja lameussidel, peajalgsetel, okasnahksetel ja k rssussidel. Rombloomad tavatseti omakorda jaotada kaheks seltsiks – *Dicyemida* ja *Heterocyemida* (Hanelt *et al.* 1996; Pawlowski *et al.* 1996), kuid uuemas teaduskirjanduses on *Heterocyemida* alla kuulunud sugukond paigutatud *Dicyemida* hulka. Seetõttu on *Rhombozoa* ja *Dicyemida* sünonüümsed ning edaspidi käsitletakse nimetust *Dicyemida* terve klassi nimena.

Vaheloomade puhul esineb senimaani arvukalt vastuolusid nii taksonoomia, süstemaatika kui fülogeneesi alal. Lõpliku lahenduseta on näiteks *Dicyemida* ja *Orthonectida* monof leetilisuse küsimus: leidub nii neid, kelle arvetes need rühmad pole lähisugulased ning ei kuulu ka mitte ühte hõimkonda, muutes *Mesozoa*  hes sellega mitteformaalseks taksoniks, mis ühendab seal paiknevaid organisme vaid morfoloogilise sarnasuse põhjal (Brusca & Brusca 2003), kui ka neid, kelle arvates leidub piisavalt nii morfoloogilisi kui geneetilisi tõendeid, et tegemist on ühise päritoluga rühmaga (Minelli 2009). Viimased tööd vaheloomade päritolu uurimise vallas toetavad nende monof leetilisuse hüpoteesi (Winnepenninckx *et al.* 1998; Petrov *et al.* 2010).

Traditsioonilise k sitluse kohaselt moodustavad vaheloomad ühe hõimkonna, mis koosneb kahest klassist, v  ttomploomadest (*Orthonectida*) ja vilasktomploomadest (*Rhombozoa* = *Dicyemida*) (Hanelt *et al.* 1996). Ajalooliselt on aga vaheloomade süstemaatika põhjustanud palju segadust ja eriarvamusi. Brusca ja Brusca (2003), viidates terminiga *Mesozoa* mitte f logeneetilisele rühmale, vaid loomadele, keda seob teatav ehituslik/anatoomiline sarnasus, paigutavad sellesse gruppi lisaks rombloomadele ja vilasktomploomadele ka naastloomad e. plaatloomad (*Placozoa*, seni kirjeldatud üks liik *Trichoplax adhaerens*) ning *Monoblastozoa* (eestikeelne termin puudub, tõlkes „ he rakukihiga loomad“). Ainsa teadaoleva naastlooma *Trichoplax adhaerens* näol on tegemist

mikroskoopilise asümmeetrilise troopilistes vetes elutseva mereorganismiga (Dellaporta *et al.* 2006), ühtlasi on ta ka hõimkonna *Placozoa* ainus esindaja; rühmale *Monoblastozoa* on aluse pannud sakslasest bioloog Johannes Frenzel, kes 1892. aastal kirjeldas Argentiina soolaluidetest leitud mikroskoopilist organismi, mille nimetas *Salinella*'ks, kuid mis seejärel on omandanud müüdi staatuse, kuna rohkem seesugust looma nähtud ega registreeritud pole. Seetõttu on sügavalt kaheldav mitte ainult *Monoblastozoa* rühma tarvilikkus loomade fülogeneesis, vaid ka selle organismi olemasolu üldiselt. Üheksateistkümnenda sajandi lõpul tarvitsesid tolle aja zooloogid vaheloomade hõimkonda paigutada igasuguseid primitiivseid hulkrakseid organisme sõltumata päritolust, keda ebapiisavate teadmiste tõttu mujale paigutada ei osatud, kuid ka *Metazoa* rühma liita ei sõandatud. Näiteks peeti *Trichoplax*'i omal ajal hüdralooma ujuvastseks ehk plaanulaks, salapärase *Salinella* arvati aga olevat kas protist või vastsestaadium (Brusca & Brusca 2003). Kuna aga ümberlökkamatult tõestatuks ei ole osutunud ükski vaheloomade süstemaatiline käsitlus, on erinevad autorid välja pakkunud erisuguseid hüpoteese. Leidub allikaid, kus nii *Orthonectida* kui *Dicyemida* on paigutatud lameusside (*Platyhelminthes*) alla ning ka selliseid, kus vaheloomad on leitud olevat polüfüleetiline rühm (Slyusarev & Kristensen 2003) ning *Dicyemida* ja *Orthonectida* pole süstemaatiliselt mitte kaks klassi, vaid kaks eraldi hõimkonda (Slyusarev & Miller 1998).

Vaheloomad on äärmiselt lihtsa ehitusega ja koosnevad umbes mõnekümnest rakust. Nende keha koosneb ripsmetega varustatud pealmisest rakukihist ning peamiselt paljunemisfunktsiooni täitvast ühest (rombloomadel) või mitmest (vööttomploomadel) sisemisest rakukihist (Petrov *et al.* 2010). Nende ehitusplaan on bilateraalsümmeetriline ning isenditel on olemas sugunäärmed, kuid mitte selgesti eristatavaid kudesid ega organeid. Kõik teadaolevad vaheloomad on selgrootute loomade obligatoorsed endoparasiidid, kes läbivad oma keerulise elutsükli käigus nii sugulise kui mittesugulise staadiumi. Vaheperemehi nende elutsükliis täheldatud pole (Petrov *et al.* 2010). Samuti ei esine vaheloomadel lootelehtede moodustumist e. gastrulatsiooni (Brusca & Brusca 2003).

2.2. Klass vööttomploomad (*Orthonectida*)

Vööttomploomad (*Orthonectida*) on vähearvukas vaheloomade klass, kõik mereselgrootute siseparasiidid, keda teatakse olevat umbes 23 liiki, mis on jaotatud nelja perekonda. Täiskasvanud isendid on enamasti lahksugulised, paljude ripsmetega kaetud, ilma seede – ega närvisüsteemita vabalt ujuvad pisikesed organismid, kelle kehapikkus on lühem kui üks millimeeter. Keha välimine kiht koosneb kindlast arvust ringikujuliselt paigutunud rakkudest, mis sõltuvalt konkreetsest rakust ja liigist võivad olla kaetud ripsmetega (*cilia*). Sisemise kihi moodustab kokkutõmmatav rakukiht, mis ümbritseb loomas arenevaid sugurakke. Ühe liigi, *Rhopalura ophiocomae* Girard puhul on leitud ka kollageenilaadseid struktuure sisaldavaid rakke (Hanelt *et al.* 1996). Üldiselt on selle loomarühma morfoloogiast vähe teada. Vabalt elavad elujärgud kasutavad vees kulgemiseks primitiivset liikumisviisi – ripsmete abil ujumist. Elektronmikroskoopia abil on vööttomploomades tuvastatud alla kümne lihaskiu (Slyusarev 2003).

Mõnede *Orthonectida* liikide elutsükleid on põhjalikult uuritud ning võrreldes sarnaste vilasktomploomadega on leitud mõningaid erinevusi. Näiteks ei esine vilasktomploomadel üheski elustaadiumis kutiikulat – kaitsefunktsiooni täitvat ekstratsellulaarset eritist – mis *Orthonectida* klassi esindajatel on olemas, seda loetakse ka üheks tunnuseks, mille alusel pole õigustatud vilasktomp – ja vööttomploomade liitmine ühte loomahõimkonda (Slyusarev 2000). Vööttomploomade elutsükklis on valdav mittesuguline staadium, amööbjas laatrakustik ehk süntsüütium (omavahel plasmajätketega seotud rakkude kogum), mida tuntakse ka plasmoodiumi nime all. Mõnede vööttomploomade plasmoodiumid võivad peremeesorganismile tõsist kahju põhjustada, näiteks on teada, kuidas parasiidid *Rhopalura ophiocomae* ja *R. granosa* oma vastavate peremeeste madutähe *Amphipholis squamata* ning karbi *Heteranomia squamula* sugunäärmed hävitavad. Mittesugulise paljunemise staadium algab sellest, et teatud tuumad plasmoodiumi sees (agameedid) kogunevad gruppidesse ning moodustavad plasmoodiumi sees eraldi üksused, millest hiljem arenevad suguliselt paljunevad, kahe rakukihiga täiskasvanud isendid. Enamasti arenevad ühest plasmoodiumist kas ainult emased või isased isendid, mõne üksiku liigi puhul aga võivad areneda mõlemad. Suguküpsuse saabudes vabanevad nad plasmoodiumi seest ning lahkuvad seejärel peremeesorganismist, veetes mõne aja vabalt vees ujudes. Viljastamine toimub, kui emane ja isane isend veekeskkonnas kohtuvad ning isane läbi väikese suguava oma sugurakud

emase tagakehasse sisestab, misjärel arenevad sügoodid. Igast sügoodist areneb ripsmetega kaetud vastsestaadium. Hiljem väljuvad vastsed emaslooma kehast ning asuvad otsima peremeesliiki, kes sõltuvalt parasiidist võivad olla nii ripsussid, kärssussid, teod, karbid, hulkharjasussid, madutähed või merituped. Peale peremeesorganismi sisenemist vabanevad vastse seest rakud, millest arenevad uued plasmoodiumi elujärgud (Brusca & Brusca 2003). Senini ei olda aga kindlad, kas plasmoodiumi on õigem lugeda parasiitseks organismiks või hoopis transformeerunud koeks (Slyusarev 2003).

2.3. Klass vilasktomploomad (*Dicyemida*)

Vilasktomploomad on enamasti mereselgrootute neerudes elavad endosümbiondid või endoparasiidid. Nad on äärmiselt lihtsa ehitusega organismid, kelle keha koosneb üksnes kümnest kuni neljakümnest rakust – hulkraksete loomade seas on veel väiksemat rakkude arvu registreeritud vaid limaeosloomadel (*Myxozoa*). Vilasktomploomi on leitud paljudes maailma piirkondades – Ohhoota ja Jaapani meres, India ookeani põhjaosas, Vahemeres, Atlandi ookeani loode – ja idaosas, Mehhiko lahes, Uus-Meremaal ning Antarktika ümbrusest Scotia ja Wedelli meres. Valdav osa neist parasiitidest elutseb bentilise eluviisiga peajalgsetes – kaheksajalgades ja seepiates, kuid mõned üksikud liigid on leitud ka kalmaaridest. Senini on kirjeldatud umbes 104 liiki vilasktomploomi rohkem kui neljakümnest peajalgse liigist. Suurem osa neist on peremehespetsiifilised, kuigi enamasti leitakse ühe peremeesorganismi seest mitmeid eri liiki vilasktomploomi (Furuya & Tsuneki 2003). Seni puuduvad ümberlükkamatud tõendid sellest, et need parasiidid oma peremehele tõsist kahju oleksid tekitanud, kuid väga kõrge arvukuse korral võivad nad takistada peremeesorganismi nefriidide talitlust. Vaatamata sellele, et looduslikes tingimustes teatakse nad olevat obligatoorsed parasiidid, on neid siiski ülal peetud ka laboratoorsetes tingimustes (Brusca & Brusca 2003). On tõenäoline, et vilasktomploomad on evolutsioneerunud vabalt elavast esivanemast (Stunkard 1954).

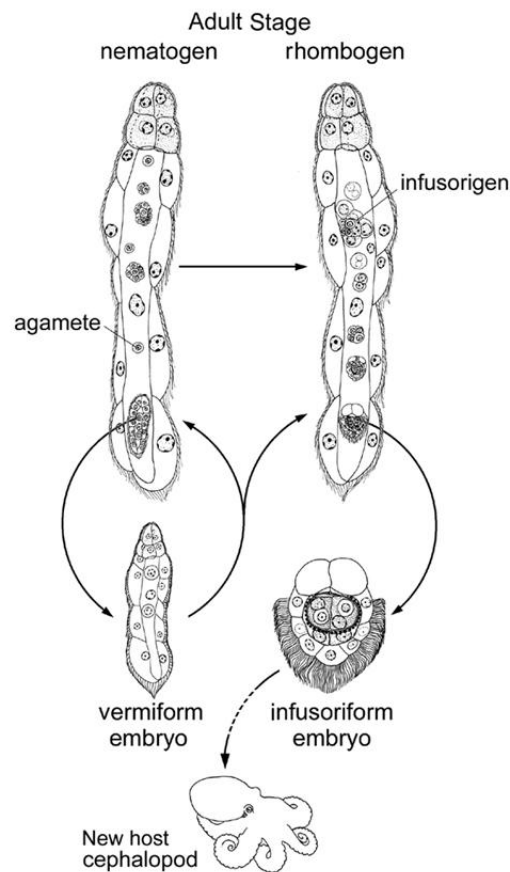
Nime *Dicyema* võttis esimesena käibele von Kölliker, kes pani oma vaatluste käigus tähele, et nende loomade elutsükli esineb kahte tüüpi embrüoid, omistades neile saksakeelsed nimed „*infusorienartig*“ ja „*wurmförmig*“ (Stunkard 1954). Vilasktomploomade elutsükli kirjeldamisel pole leidunud täielikku üksmeelt terminoloogia vallas, mistõttu on nende erinevaid eluetappe nimetatud eri nimedega (Brusca & Brusca 2003), kuid valdavas osas on jäänud senini von Köllikeri pakutud terminite juurde, mis on

küll inglise keelde kohandatud. Sellest tulenevalt tuntakse teaduskirjanduses vilasktomploomade elutsükli kahte elujärku vastavalt „ussilaadse staadiumi“ (ingl „*vermiform stage*“, kuid käibel ka terminid „nematogeen“ või „rombogeen“) ning „ripslooma-laadse staadiumi“ (ingl „*infusoriform stage*“) nime all. Terminid „rombogeen“ kasutatakse mõnel pool viitamaks arenevale suguliselt paljunevale elujärgule, kuid ilmselt on ohutum viidata pelgalt suguliselt ja mittesuguliselt paljunevale nematogeenile, kuna rombogeeni ja nematogeeni staadiumite erinevuste osas pole konsensusele jõutud.

Dicyemida täiskasvanud, ussilaadne vorm e. nematogeen on vaid 0,5 kuni 2,5 mm pikk. Selle ehitus piirdub välimise somaatiliste rakkudest moodustunud kattega, mis ümbritseb sisemuses paiknevat ühte pikka aksiaalrakku, mille tsütoplasmas paikneb omakorda arvukalt väikesed spetsiaalseid rakke diameetriga umbes 5-7 μm sõltuvalt liigist, mida tuntakse aksoblastide nime all (kirjanduses esineb ka nimetus „agameet“). Vilasktomploomade mittesugulise paljunemise etapis arenevad neist rakkudest omapärase embrüogeneesi tulemusena emasisendi aksiaalraku sees uued algelised nematogeenid. Arengu käik on lihtne ja mitmete liikide puhul põhjalikult uuritud ja kirjeldatud. Nematogeense embrüo kolm peamist rakutüüpi agameet, aksiaalrakk ning perifeersed rakud on identifitseeritavad juba embrüo kolme raku staadiumis (Furuya *et al.* 2001). Välja arenenud organism lahkub seejärel emasisendist ning ujub mõnda aega vabalt ringi peremeesorganismi nefriidides. Vilasktomplooma eesmises otsas paikneb umbes neljast kuni kümnest somaatilisest rakust moodustunud struktuur (ingl „*polar cap*“ või „*calotte*“), mille ripsmekarvakesed paiknevad posterioorsete rakkudega võrreldes tihedamalt ning on lühemad. Selle, nn kaloti, suurus ja kuju on liigispetsiifiline, mis võib olla arenenud kohastumusena peremehe neerude erinevatesse piirkondadesse kinnitumiseks, tänu millele on tekkinud omapärane nišijaotus, mis võimaldab eri liiki vilasktomploomadel ühe peremehe nefriidides koos eksisteerida (Furuya *et al.* 2003). Kasutades nimetatud struktuuri, kinnitavad parasiidid end lõpuks peremehe nefriididele, peale mida toimub areng täiskasvanud vormiks. Nematogeen tarbib teralist ja molekulaarset ainet peremehe uriinist, kasutades selleks fago – ja pinotsütoosi. Keha välispinna ripsmeid kasutab parasiit ilmselt selleks, et aidata kaasa peremehe kehavedeliku liikumisele üle parasiidi kehapiinna. Hetkel leidub vähe informatsiooni sellest, missugune näeb välja nende vaheloomade elutsükli etapp, kus parasiidid pole oma peremehega seotud ning elavad meres vabalt ujudes (Brusca & Brusca 2003).

Samamoodi on vastuseta küsimus, kuidas on reguleeritud parasiidi sugulise ja mittesugulise paljunemise vaheldumine, kuigi on teada, et see toimub kõikide teadaolevate

vilasktomplooma liikide puhul (Furuya & Tsuneki 2003). Välja on pakutud versioon, et ülemineku mitesuguliselt sugulisele paljunemisele võib olla initsieeritud parasiidi arvukuse kasvust mingi kindla piirini ühes peremeesorganismis (Furuya & Tsuneki 2003), alternatiivsete arusaamade kohaselt põhjustavad seda kas muutused peremehe uriini keemilises koostises või peremeesorganismi suguküpsuse saabumine. Suguliselt paljuneva vormi areng algab sellest, et nematogeense vormi somaatiliste rakkude mõõtmed suurenevad tänu sinna kogunevale rebulaadsele materjalile. Seejärel arenevad nematogeenide aksoblastidest paljurakulised, ümbritsevast munarakkude kihist ja sisemisest spermide massist koosnevad struktuurid, nn infusorigeenid e. hermafrodiitsed gonaadid.



Joonis 1. – Vilasktomploomade (*Dicyemida*) elutsükel skemaatiliselt. Punktiirjoon tähistab seni teadmata protsessi, mille abil parasiit uusi peremehi nakatab (Furuya & Tsuneki 2003).

Toimub viljastumine ning arenevad sügoodid, kellest lõpptulemusena kujunevad *infusoriform*-tüüpi, ehk nn ripslooma-tüüpi vastsed, mis koosnevad umbes 37 kuni 39

rakust ning mis on nematogeeni staadiumiga võrreldes rohkem differentseerunud. Nende primitiivne ehitus hõlmab endas nelja tsentraalset rakku, mis on kapseldatud ripsmetega kaetud väliskihi rakkude ümbrise sisse, lisaks eristatakse sel vormil kahte apikaalset rakku olendi anterioorses otsas. Larvid eralduvad oma vanemast ning liiguvad edasi väliskeskkonda läbi peremeesorganismi poolt eritatud uriini (Brusca & Brusca 2003). On võimalik, et nematogeen e. ussilaadne elujärk on taandarenenud tänu spetsialiseerumisele peremehe erituselundites elamiseks ning ripslooma-tüüpi elujärk vabalt elutseva vormina esindab parasiidi ehitust muutumatul, algupärasel kujul. Siiski ei vasta kummagi elustaadiumi ehitus sellisele kompleksusele, et neid võiks pidada tõelisteks kudedeks (Furuya & Tsuneki 2003).

Dicyemida üksikasjalik elutsükkel (joonis 1) ei ole teada ning paljud aspektid püsivad oletuse tasandil. Kõige tõenäolisemalt jätkub peremehest väljunud vastse elukaik nii, et ta vajub veekogu põhja, kuna selle apikaalsed rakud on suhteliselt rasked ning talitlevad ballastina. Järgneb uue peremeesorganismi nakatamine larvi poolt läbi teadmata mehhanismi ning vastne, jõudnud peremehe sisemusse ja liikudes arvatavasti ringeelundkonna kaasabil, leiab lõpuks tee peajalgse nefriididesse, kus temast areneb järgmine, nematogeeniga sarnane vorm, kuid millel erinevalt viimasest on kolm aksiaalset rakku. Hiljem hakkab parasiit taas mittesugulisel teel paljunema, kuni mingid vaieldavad, teadmata faktorid tingivad ülemineku sugulisele paljunemisele ning elutsükkel algab otsast peale (Brusca & Brusca 2003). Furuya ja Tsuneki (2003) on välja pakkunud, et peajalgseid võisid algupäraselt olla *Dicyemida* vaheperemehed ning lõpp-peremeesteks olid hoopis väljasurnud mesosoikumi ajastu mereromajad perekonnast *Mosasaurus*, kuid tavapärasest kiirema suguküpsuse saabumise – progeneesi – tulemusena kadus lõpp-peremehe staadium parasiidi elutsüklist.

2.4. Senised fülogeneetilised hüpoteesid

Tänase päevani on väga vähe teada vaheloomade päritolust ja asukohast elupuul. Üle poole sajandi vana debatt selle üle, kas vaheloomad on vahelüli alamate ja ülemate loomade vahel või on nende ülimalt primitiivsed tunnused algupäraselt ussilaadse looma äärmusliku sekundaarse degeneratsiooni tulemus, ei ole seni ammendavat vastust saanud (Noto & Endoh 2004). Kujutlus vaheloomadest kui evolutsioonilisest üleminekuetapist ainuraksetelt loomadelt hulkraksetele on teadlaste meeli erutanud juba aastakümneid.

Näiteks väitis Ameerika zooloog Libbie Hyman 1940. aastal, et kui suudetaks näidata, et *Mesozoa* loomarühm on tõepoolest üleminekuetapp hulkraksete loomade suunas, mitte aga parasitismist tingitud taandarengu tulemus, oleks see ülioluline loomade fülogeneesi seisukohast, kuna see annaks tugevaid tõendeid sellest, et 1) hulkraksete organismide kujunemise esimene etapp oli sugurakkude liikumine keha sisemusse; 2) esimesed hulkraksed loomad ei olnud seest „õõnsad“; 3) ning Ernst Haeckeli rekapitulatsiooniteooria on ekslik (Stunkard 1954). Vastavalt sellele, kumba hüpoteesi eelistatakse, paigutatakse vaheloomade rühm üleüldises elupuus kas hulkraksete loomade juure lähedusse või lameusside (*Platyhelminthes*) klaadi, teinekord on neid aga peetud hoopis hulkraksetest sõltumatult evolutsioneerunud loomarühmaks (Nielsen 2001).

Paljud autorid on ühel meelel, et *Mesozoa* kuulub hulkraksete (*Metazoa*) hulka (Zrzavy 2001) ning on päritolult tõenäoliselt algeline kolmelehtne (kahekülgne) loomarühm (Katayama *et al.* 1995; Furuya *et al.* 1996; Furuya *et al.* 1997). Tunnuseid, mis sellele viitavad, on mitmeid: bilateraalne ehitusplaan, sarnasused oogeneesis, lihaskiudude sarnased struktuurid võõttomploomadel, viburite basaalkihakese orientatsioon ning muud detailsemad sarnasused nende raku – ja arengubioloogias. Veel möödunud sajandi lõpus oli üks põhilisemaid argumente vaheloomade mittekuulumise toetuseks pärishulkraksete hulka fakt, et vaheloomade mitokondrite kristad on torukujulised, mitte lamedad nagu hulkraksetel (*Metazoa*). Edasiste uurimuste valguses kaotas see tunnus aga oma tähtsuse ning hetkel seda fülogeneesi seisukohalt olulise tunnusena ei käsitleta (Zrzavy 2001). Siiski esineb näiteks vilasktomploomade puhul lisaks eelpool mainitud mitokondrite kristadele veel teisigi selliseid tunnuseid, mille alusel paigutavad mõned autorid nad ainuraksete loomade (*Protozoa*) hulka kuuluvaks, näiteks tavapärase ekstratsellulaarse matriksi puudumine, opaliinprotistidele ja ripsloomadele iseloomulik ripsmevõru, endotsütoosi kasutamine peeneteralise aine omastamisel, rakkudevaheline kommunikatsioon ilma mediaatoraineta ning selgesti eristuvad sugulise (rombogeense) ja mitesugulise (nematogeense) paljunemise faasid (Noto & Endoh 2004; Suzuki *et al.* 2010).

Kolmelehtsed e. kahekülgset loomad (*Bilateria*) omakorda jagatakse zooloogia viimaste arengute põhjal kolme suuremasse klaadi, mis ilmselt lahknesid juba enne Kambriumi ajastut 540 miljonit aastat tagasi – teissuused (*Deuterostomia*), keerdloomad (*Lophotrochozoa*) ning kestloomad (*Ectydozoa*) (Halanych 2004). Vaheloomade paigutumine selles kontekstis ei ole seni ühest kinnitust saanud, välja on pakutud nii seda, et *Mesozoa* on sõsarrühm kogu ülejäänud kahekülgsete klaadile (Hanelt *et al.* 1996) kui ka

seda, et tegemist on *Lophotrochozoa* hulka kuuluva klaadiga. Viimase kasuks räägivad molekulaarsed uurimused, kus näidati sarnasusi kolme regulaatorgeeni *Hox*, *Otx* ja *brachyury* ekspressioonis vaheloomal *Dicyemida orientale* võrdluses keerdloomade omaga (Kobayashi *et al.* 2009) ning tuvastati sama liigi *DoxC* geeni ortoloogsus mitmete keerdloomade hulka kuuluvate loomaliikidega, mis annab alust arvata, et vaheloomad on suguluses lameusside, limuste, rõngusside ja käsijalgsetega ning toetab hüpoteesi, et vaheloomad on koos limaeosloomadega (*Myxozoa*) üks äärmuslikumaid näiteid ehitusplaani taandarengust parasiitse eluviisi tulemusel (Kobayashi *et al.* 1999). Üks väheseid valgusjärjestuste põhjal tehtud uuringuid näitas aga, et klass *Dicyemida* on lähedasem sugulane kõrgematele keerdloomadele nagu limused ja rõngussid kui ta on seda lameussidele (hõimkond *Platyhelminthes*) (Suzuki *et al.* 2010).

Noto ja Endoh (2004) on välja pakkunud omapärase teooria vilasktomploomade klassi põlvnemise seletamiseks. Need autorid usuvad, et *Dicyemida* näol võib tegemist olla ainuraksete protistide ja hulkraksete loomade kimääriga, kelle ürgne esivanem oli ainurakne parasiit, kes oma hulkraksel peremehel endotsütoosi teel nugides omastas horisontaalse geeniülekanne teel peremeesorganismi geneetilist materjali. Horisontaalne geeniülekanne on juba varasemalt arvatud olevat üks peamisi põhjuseid seletamaks anomaaliaid ja vasturääkivusi nii prokarüootide kui ka eukarüootide fülogeneesi puhul (Andersson *et al.* 2003). Nende autorite järgi aitaks see seletada 5S rRNA geeni analüüside, mis viitavad vilasktomploomade kuulumisele pigem protistide hulka, vasturääkivust ülejäänud eraldatud geenide analüüsi tulemustest, mis paigutavad nad *Metazoa* hulka – võib ju esimese puhul tegemist olla geneetilise jäänukiga oma ammuselt protistist esivanemalt. Lisaks on teada, et vilasktomploomade toidu sekka satub arvukalt peremehe koetükikesi ning spermatooside (Noto & Endoh 2004). Siiski on aga põhjust kahelda analüüsides, mis on kasutanud 5S rRNA-d fülogeneesi uuringuteks, kuna hilisemates töodes on selle kõlblikus põlvnemissuhete väljaselgitamiseks seatud tõsise kahtluse alla (Halanych 1991).

2.5. Töö eesmärgid

Senised teadaolevad tööd vilasktomploomade põlvnemise väljaselgitamiseks on kasutanud 18S rDNA-d , inneksiini valkude aminohappelisi järjestusi (Suzuki *et al.* 2010), 18S ja 28S rRNA geene (Petrov *et al.* 2010), *Otx* ja *brachyury* geenide kodeeritud aminohappejärjestusi (Kobayashi *et al.* 2009), β -tubuliinide aminohappejärjestusi (Noto & Endoh 2004) ja 5S RNA-d (Ohama *et al.* 1984) . Lisaks leidub töid, mis tõstatavad hüpoteese *Dicyemida* fülogeneesi kohta tuginedes morfoloogilistele tunnustele nagu näiteks ekstratsellulaarse matriksi struktuur (Czaker 2000).

Käesoleva töö eesmärgiks on analüüsida kõiki avalikesse andmebaasidesse lisatud vilasktomploomade valgujärjestusi ning koostada nende alusel uuemaid ja usaldusväärsemaid suurima tõepära fülogeneesimeetodeid kasutades liigipuu, selgitamaks välja nende mõistatuslike loomade põlvnemist. Arvestades, et analüüsi kaasatavate taksonite valik on laiahaardeline ning hõlmab endas evolutsiooniliselt kaugeid taksoneid, kasutatakse antud töös fülogeneesipuu rekonstrueerimiseks valgujärjestusi, mis käesolevas kontekstis omavad teatavaid eeliseid DNA nukleotiidi järjestuste ees (Yang *et al.* 1998; Lemey 2009). Nukleotiidi järjestuste kasutamine elupuu juure lähedal paiknevate organismide põlvnemissuhete väljaselgitamiseks võib kujuneda problemaatiliseks. Näiteks Yang jt (1998) töid peamiste puudustena esile selle, et järjestused on halvasti joonduvad, eri liikide puhul võivad nukleotiidide esinemissagedused väga suurel määral varieeruda ning asendumiste saturatsioon e. küllastumine summutab maha olulise osa fülogeneesi taastamiseks vajaminevast informatsioonist.

Autorile teadaolevalt ei ole seni üheski vilasktomploomasid puudutavas uurimuses kaasatud analüüsi rohkem kui mõne üksiku geeni järjestused. Samuti pole siinkõneleja leidnud uurimusi, mis oleks vilasktomploomade fülogeneesi valgujärjestuste põhjal uurides kaasanud analüüsi paljusid erinevaid loomahõimkondasid nagu käesolevas töös.

3. Materjalid ja metoodika

3.1. Andmestiku kogumine

Uurimuseks vajaminevad valgujärjestused nii *Dicyemida* kui teiste taksonite kohta koguti avalikust (The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) valguandmebaasist, ühe liigi, ameerika kammlooma (*Mnemiopsis leidyi*) järjestusi ka avalikust National Human Genome Research Institute (<http://research.nhgri.nih.gov/mnemiopsis/>) andmebaasist. Taksonite nimekirja kuulus lisaks vilasktomploomadele kokku 31 erinevat loomaliiki, hõimkondade kaupa esines andmestikus kuus keelikloom (Chordata), üks okasnahkne (Echinodermata), üks ürgkeelikloom (Hemichordata), neli lülialgset (Arthropoda), kolm ümarussi (Nematoda), kolm lameussi (Platyhelminthes), kaks rõngussi (Annelida), kolm limust (Mollusca), kaks ainuõsset (Cnidaria), naastloom (Placozoa), üks käsn (Porifera), üks kammloom (Ctenophora) ning välisrühma liikidest kaks kaelusviburlast (Choanoflagellata) ning *Filasterea* hulka kuuluv *Capsaspora owcarzaki*. Liikide nimekiri sai koostatud selliselt, et selles oleks esindatud mitmeid erinevaid loomahõimkondasid esindavad mudelorganismid, kelle genoomist ja proteoomist leidub rohkelt infot eelpool mainitud avalikes andmebaasides. Välisrühma liikideks valitud *C. owcarzaki* on aga koos kaelusviburlaste hulka kuuluvate protistidega teadaolevalt lähimad hulkaraksete loomade ainuraksed sugulased (Suga *et al.* 2013). NCBI valguandmebaasist otsiti esmalt käsitsi *Dicyema* järjestusi. Kui mõned järjestused erinesid üksteisest vaid üksikute aminohappejääkide osas, valiti neist üks edasisteks analüüsideks juhuslikult; kui üks järjestus tuvastati olevat teise järjestuse osa (pikkuselt erinevad, kuid kattuvast osas identsed), valiti neist välja kõige pikem. Seejärel otsiti väljavalitud vilasktomploomade järjestustele homolooge kasutades BLAST algoritmi (Altschul *et al.* 1997), *e*-väärtuse ülempiiriks 10^{-20} .

Homoloogseid järjestusi etteantud liikide genoomide seast otsiti annoteeritud valkude (REFSEQ) andmebaasist ning mitteködunud (*non-redundant*) valkude andmebaasist. Juhul kui nendest allikatest *e*-väärtuse kriteeriumit rahuldavaid vasteid ei leidunud, otsiti mudelorganismi perekonna seast ning kui ka siis vasteid ei leidunud, siis EST (*Expressed sequence tags*) andmebaasist, millest kogutud DNA järjestused hiljem valgujärjestusteks transleeriti. Kui nende etappide lõpuks huvipakkuva liigi või perekonna

seast andmebaasid homoloogseid geenijärjestusi ei tuvastanud, jäi taksoni kohta täitma tühi. Kõigi üksikute geenandmetike põhjal koostati fülogeneesipuud, mille kvaliteedi välja selgitamiseks hinnati visuaalse vaatlusega, kas puudelt on võimalik eristada ortoloogseid järjestusi ning paraloogide esinemisel nende paigutustumist fülogeneesipuul - kas nende seast on võimalik ortoloogseid järjestusi eristada. Puude topoloogia võimaldas hinnata, kas üldtunnustatult monofüleetilised rühmad (näiteks keelikloomad, lüljalgsed, lameussid) ka üksikute geenipuudel sarnaselt klasterduvad, andes seeläbi täiendavat toetust geeni informatiivsusele fülogeneesi seisukohast (vt. lisad). Neil alustel otsustati iga geeni kohta, kas kaasata see liitmaatriksisse või ebapiisava fülogeneesi puudutava teabe puudumisel geen kõrvale jätta. Puude visualiseerimisel oli kasutusel programm FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Tabel 1. Taksonite nimekiri koos andmebaasidega, kust järjestused alla laaditi.

Hõimkond	Taksoni nimi	Andmebaas
Keelikloomad	Dicyema	NCBI Protein
	Homo sapiens	NCBI Protein - REFSEQ
	Gallus gallus	NCBI Protein - REFSEQ, NR
	Takifugu rubripes	NCBI Protein - REFSEQ, NR
	Branchiostoma floridae	NCBI Protein - REFSEQ
	Ciona intestinalis	NCBI Protein - REFSEQ, EST
Okasnahksed	Oikopleura dioica	NCBI Protein - NR
	Strongylocentrotus purpuratus	NCBI Protein - REFSEQ
Ürgkeelikloomad	Saccoglossus kowalevskii	NCBI Protein - REFSEQ, NR
Lüljalgsed	Drosophila melanogaster	NCBI Protein - REFSEQ
	Nasonia vitripennis	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
	Daphnia pulex	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
	Ixodes scapularis	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
Ümarussid	Caenorhabditis elegans	NCBI Protein - REFSEQ
	Trichinella spiralis	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
Limused	Brugia malayi	NCBI Protein - REFSEQ
	Aplysia californica	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
	Lottia gigantea	NCBI Protein - NR
Rõngussid	Crassostrea gigas	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
	Capitella teleta	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
	Helobdella robusta	NCBI Protein - NR
Lameussid	Schistosoma japonicum	NCBI Protein - REFSEQ, NR
	Echinococcus granulosus	NCBI Protein - NR
	Schmidtea mediterranea	NCBI Protein - NR, EST
Ainuõõssed	Nematostella vectensis	NCBI Protein - REFSEQ
	Hydra vulgaris	NCBI Protein - REFSEQ
Naastloomad	Trichoplax adhaerens	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
Käsnad	Amphimedon queenslandica	NCBI Protein - REFSEQ, NR, EST
Kammloomad	Mnemiopsis leidyi	NHGRI, NCBI Protein - REFSEQ
Kaelusviburlased	Monosiga brevicollis	NCBI Protein - REFSEQ
	Salpingoeca rosetta	NCBI Protein - REFSEQ
Filasterea	Capsaspora owczarzaki	NCBI Protein - REFSEQ, NR

3.2. Joonduste koostamine ja puude konstrueerimine

Valgujärjestuste joondamised teostati MAFFT'i (Kato *et al.* 2002) serveris (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) kasutades Needleman-Wunchi globaaljoonduse algoritmi nimega „G-INS-i“. G-INS-i, olles arvutusmahukas, on aminohapete joondamiseks üks täpsemaid seni tuntud algoritme (Golubchik *et al.* 2007). Joonduste korrigeerimised ja editeerimised sooritati programmiga BioEdit. Esmased fülogeneesipuud konstrueeriti suurima tõepära (*maximum likelihood*) meetodil kasutades PHYML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) programmi (Guindon & Gascuel 2003), kus aminohapete asendusmaatriksiks valiti LG (Le & Gascuel 2008). Lisaks jagati valgu järjestuse positsioonid nelja evolutsiooni kiiruselt erinevasse kategooriasse vastavalt gamma jaotuse parameetritele (Yang 1994). Suurima tõepära puu otsimiseks kasutati SPR (*Subtree Pruning and Regrafting*) ja NNI (*Nearest Neighbour Interchange*) algoritme. Lisaks arvutati puude harude toetuste hindamiseks aLRT (Approximate Likelihood-Ratio Test) väärtused (Anisimova & Gascuel 2006), ülejäänud parameetrid jäid vaikimisi antuteks.

Kõigist analüüsitud 74-st *Dicyema* valgust osutusid üksikanalüüside põhjal potentsiaalselt headeks fülogeneesi markeriteks 16, nendest neli mitokondri genoomi poolt kodeeritud geeni. Kõik liitmaatriksisse kaasatud geenid ning nende viitenumbrid on saadaval magistritöö lisades. Üksikute geenimaatriksite põhjal koostati liitmaatriksid kasutades programmi FASconCAT v1.0 (Kueck & Meusemann 2010), enne liitmaatriksi koostamist töödeldi kõik sinna liidetavad joondused programmiga Gblocks (Talavera & Castresana 2007), kõrvaldamaks joonduses esinevad tühjad, vähekonserveerunud või halvasti joondunud positsioonid. Joonduse korrigeerimisel kasutati vastavalt autorite soovitusetele kõige leebemaid kriteeriume, mis eemaldasid joondusest vaid kõige ebausaldusväärsemad positsioonid.

3.3. Fülogeneetiliste analüüside mudelid

3.3.1. Le ja Gascuel' (LG) mudel

Valgujärjestuste põhjal teostatavate fülogeneetiliste analüüside puhul on valdava enamuse meetodite aluseks aminohapete asendusmaatriksid – 20×20 maatriksid, mille elementideks on aminohapete asendumiste tõenäosused ühest teiseks. Suurima tõepära

(*maximum likelihood*) ning Bayesi meetodites kasutatakse asendusmaatrikseid andmete tõepära hindamiseks, arvutades asendumiste tõenäosused fülogeneesipuu harudele (Le & Gascuel 2008; Le *et al.* 2012). Paljud standardsed maatriksid nagu PAM, JTT või WAG on koostatud rohke empiirilise andmestiku põhjal ning eeldavad, et aminohapete sagedused ning nende evolutsioonimudel püsivad ajas konstantsena ning kehtivad samasugusena üle kogu aminohappejärjestuse (Whelan & Goldman 2001).

Siiski on aga teada, et ühe valgu eri positsioonid ei evolutsioneeru ühesuguse kiirusega. Tulenevalt kas tugevatest funktsionaalsetest või struktuursetest piirangutest evolutsioneeruvad mõned positsioonid väga aeglaselt ning teised, valikusurvele mittealluvad positsioonid kiiresti (Le & Gascuel 2008). DNA nukleotiidijärjestuste põhjal näitas Yang (1993), et asendumiste kiirused eri positsioonidel on kirjeldatavad diskreetse gammajaotuse (Γ) abil, sageli kombineeritakse seda ka muutumatute positsioonide kategooriaga (Gu *et al.* 1995). Lähtudes sellest, et gammajaotuse kasutamine suurima tõepära meetodil konstrueeritud fülogeneesipuudes parandab märkimisväärselt selle usaldusväärsust, esitasid Le ja Gascuel (2008) omapoolse asendusmaatriksi aminohapete jaoks, mis võtab arvesse erinevaid asenduskiiruseid positsioonide vahel. Saanud nime oma loojate nimetähtede järgi, on seda maatriksit kasutavad suurima tõepära puud katseliselt andnud usaldusväärsemaid tulemusi kui vanemad, näiteks WAG ja JTT maatriksid.

3.3.2. LG4X ja LG4M – nelja maatriksiga mudelid

Tavapäraselt kasutatakse valgujärjestuste põhjal fülogeneesi konstrueerimises ühte aminohapete asendusmaatriksit. Kuna aga valgu eri positsioonide evolutsioon võib olla väga heterogeenne, olles sõltuv nii geneetilisest koodist, eksponeeritusest lahustile (kas vesi või lipiidid) ning valgu sekundaar – ja terstiaarstruktuurist ning funktsioonist, võib ühe asendusmaatriksi omistamine tervele valgujärjestusele olla liialt üldistav ning oluline osa informatsioonist võib kaduma minna (Le *et al.* 2012). Olgugi, et ka standardsed maatriksid suudavad paljudel juhtudel anda usaldusväärseid tulemusi (Keane *et al.* 2006), on õigustatud alternatiivsete mudelite kasutamine, mis kätkevad endas erinevaid asendusmaatrikseid erinevate positsioonide tarbeks. Le jt. (2012) pakkusid eelmise, LG mudeli edasiarendusena välja kaks uut mudelit, LG4M ja LG4X. LG4M mudeli puhul hinnatakse esmalt valgu erinevaid positsioone nende evolutsioonimäära alusel ning jaotatakse need selle põhjal nelja erinevasse kategooriasse, igaühe aminohapete

asendumised modelleeritakse vastavalt gammajaotusele, mis tähendab, et kokku võtab mudel arvesse nelja asendusmaatriksit. LG4X, samuti nelja asendusmaatriksiga mudel, mis katseliselt näidati andvat paremaid tulemusi kui LG4M, erineb viimasest selle poolest, et asendumiste kiirused pole piiratud gammajaotusega ning erinevate kategooriate kiirused varieeruvad vabalt vastavalt andmestikule (Le *et al.* 2012). Kuigi ribosomaalsete valkudega teostatud elupuu analüüs eelpoolmainitud mudelite vahel märkimisväärsed erisusi ei näidanud (Lasek-Nesselquist & Gogarten 2013), peatutakse käesolevas töös ennekõike LG4X mudeli abil saadud tulemustel.

3.3.3. Struktuuripõhised – ja segamudelid

Valkude sekundaarstruktuur ning eksponeeritus lahustile mõjutavad olulisel määral aminohapete asendumismäära (Le & Gascuel 2010). Võtmaks arvesse neid tegureid, pakkusid Le ja Gascuel (2010) välja uudse mudeli, mis jaotab valkude saidid ning neile kehtivad asendusmaatriksid kategooriatesse lähtuvalt nende struktuursetest omapäradest. Kuna valgu struktuuri pealispinnal asuvad saidid võivad evolutsioneeruda 3-4 korda kiiremini nendest saitidest, mis on vähem avatud kokkupuutele (sinna alla kuuluvad enamasti hüdrofoobsed aminohapped) (Le *et al.* 2008), jaotatakse struktuuripõhises mudelis valkude erinevad saidid kahte kategooriasse kokkupuudetele avatuse ja peidetuse alusel ning vastavalt sellele arvutatakse asendumismäärad. Seda liigitust tähistab lühend EX. Lühend EHO tähistab teist liigitust, kus saidid on jaotatud kolme rühma sekundaarstruktuuri alusel: väljaulatuvad positsioonid, alfa-heeliksit moodustavad positsioonid (enamastialaniinid) või muud positsioonid. Kombineerides kaht eelnevat jaotust on tulemuseks keerukam EX_EHO, kuue erineva kategooria ja aminohapete asendusmaatriksiga mudel, mis on eksperimentaalsete testimiste põhjal pakkunud usaldusväärsemaid tulemusi kui kõik standardseid asendusmaatrikseid (JTT, WAG) kasutavad suurima tõepära meetodid, kuid samuti EX ja EHO eraldiseisvatest tulemustest (Le & Gascuel 2010). Nn osamudelite seas, mille põhimõte seisneb igale andmestiku kategooriale vastavate asendustõenäosuste väljaselgitamisel ning mis püüavad leida kompromisse äärmuste (üks maatriks kogu andmestiku kohta versus eraldi maatriks iga positsiooni kohta) vahel (Rannala & Yang 2008) on eelpool kirjeldatud mudelid käesoleval hetkel ühed usaldusväärsematest.

Alternatiivne võimalus segamudelite puhul on seesugune, kus saitide kategooriad ei ole eelnevalt ette määratud (nt. avatud või peidetud sait), vaid need luuakse empiiriliselt vastavalt andmestikule. PHYML pakett on seesugusteks mudeliteks UL2 kahe kategooria ning UL3 kolme kategooria puhul (Le *et al.* 2008).

4. Tulemused

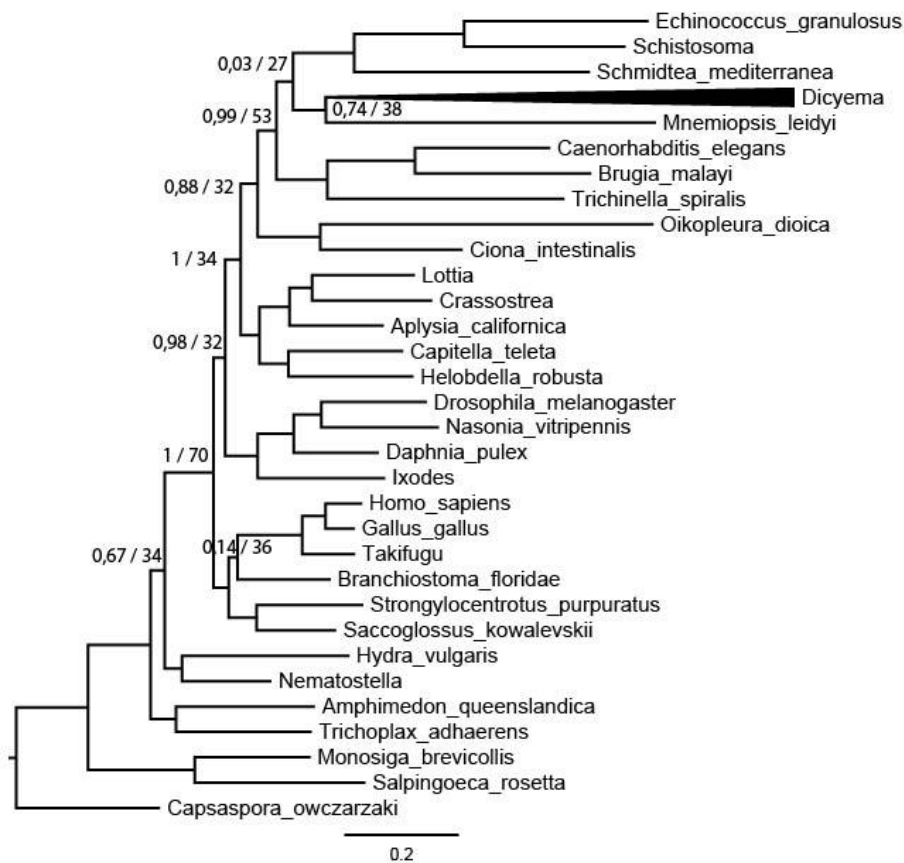
Fülogeneetilised analüüsid teostati liitmaatriksitega, mis sisaldasid endas: 1) kõigi 32 loomaliigi kõiki 16 väljavalitud geeni järjestusi (kokku 5439 aminohapet); 2) 32 loomaliigi 12 geeni järjestusi (kokku 4344 aminohapet), s.t. maatriksist eemaldati kõik neli mitokondri geeni (tsütokroomi oksüdaasi subühikud 1-3 ning NADH dehüdrogenaasi subühik I); 3) 26 loomaliigi 12 mittemitokondri geeni järjestust, kusjuures taksonite nimistust olid kõrvaldatud ümar – ja lameusside klad, mis eelnevate analüüside puhul osutusid olema *Dicyema* sõsarrühmad. Kõigi konstrueeritud puude toetuse hindamiseks arvutati harude aLRT väärtused SH (Shimodaira-Hasegawa) protseduuriga ning LG asendusmaatriksit kasutanud puudes arvutati ka Bootstrap'i (100 replikaadiga) väärtused.

Erinevaid mudeleid kasutanud analüüsid paigutasid vilasktomploomad üpriski sarnasesse asukohta fülogeneesipuul ning märgatavaid vasturääkivusi mudelite vahel ei esinenud. Kõiki geene ja kõiki taksoneid hõlmavas kogumaatriksis (joonis 2) asetus *Dicyema* koos ameerika kammloomaga (*Mnemiopsis leidyi*) lameusside sõsarrühmaks, kuid minimaalsed statistilised toetused sellele kladile (aLRT = 0,03, bootstrap = 27) ei anna alust seda tulemust tõsiselt võtta, lisaks on vastuoluline kammloomade paiknemine, kuna kõige uuemad genoomiuringud toetavad selle taksoni paiknemist elupuus kõigi loomade sõsarrühmaks (Ryan *et al.* 2013).

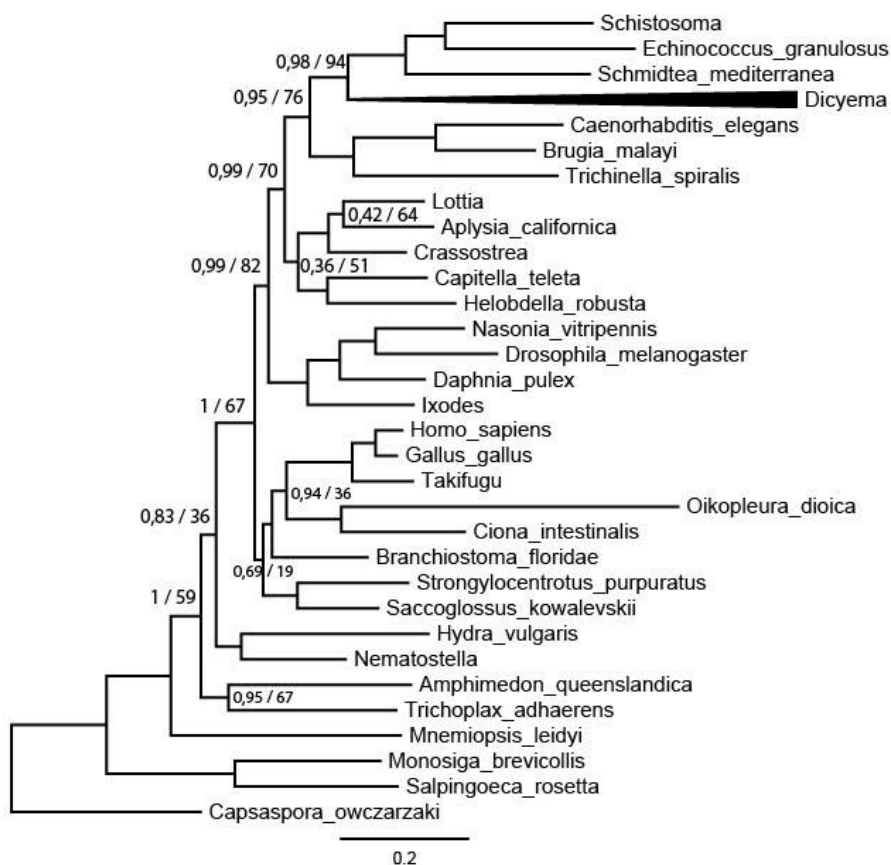
Analüüsid mittemitokondri geenidega annavad statistiliselt olulisemaid tulemusi. Kuna on teada, et loomade mtDNA evolutsioneerub äärmiselt kiiresti (Brown *et al.* 1979), siis on näidatud, et just evolutsiooniliselt kaugete organismirühmade põlvnemise väljaselgitamiseks pole mtDNA informatiivne marker ning võib anda vastuolulisi tulemusi (Zardoya & Meyer 1996). Sel põhjusel teostati käesolevas töös mitmete erinevate mudelitega analüüse, kust viimased olid liitmaatriksist välja jäetud. LG asendusmaatriksiga analüüs kõigi 32 taksoniga (joonis 3) paigutab vilasktomploomad samuti lameusside

sõsarrühmaks, kuid statistiliselt on need harud tunduvalt paremini toetatud (aLRT = 0,98, bootstrap = 94). Evolutsiooniliselt lähedased sugulased on saadud tulemuste põhjal ka ümarussid ning kogu moodustunud klaadi sõsarrühma kuuluvad limused ning rõngussid. Nii LG4X (joonis 4) kui EXEHO (joonis 5) asendusmaatriksit kasutanud analüüsid paigutasid vilasktomploomad samuti lameusside sõsarrühmaks, kusjuures statistilised toetused neile klaadidele on maksimumilähedased. Kõikide erinevate mudelite (LG, LG4X, EX2, EX3, EHO, UL3, EXEHO) lõikes oli absoluutväärtuselt vähim logaritmiline tõepäraväärtus (*log-likelihood*) UL3 asendusmaatriksi puhul (107340.90) ning suurim LG asendusmaatriksit kasutanud analüüsis (109018.48). Kuna puude topoloogia osas olid eri mudelitega saadud tulemused väga väikeste erinevustega, siis jäävad antud töös käistlemata EX2, EX3, EHO ja UL3 mudelitega saadud fülogrammid.

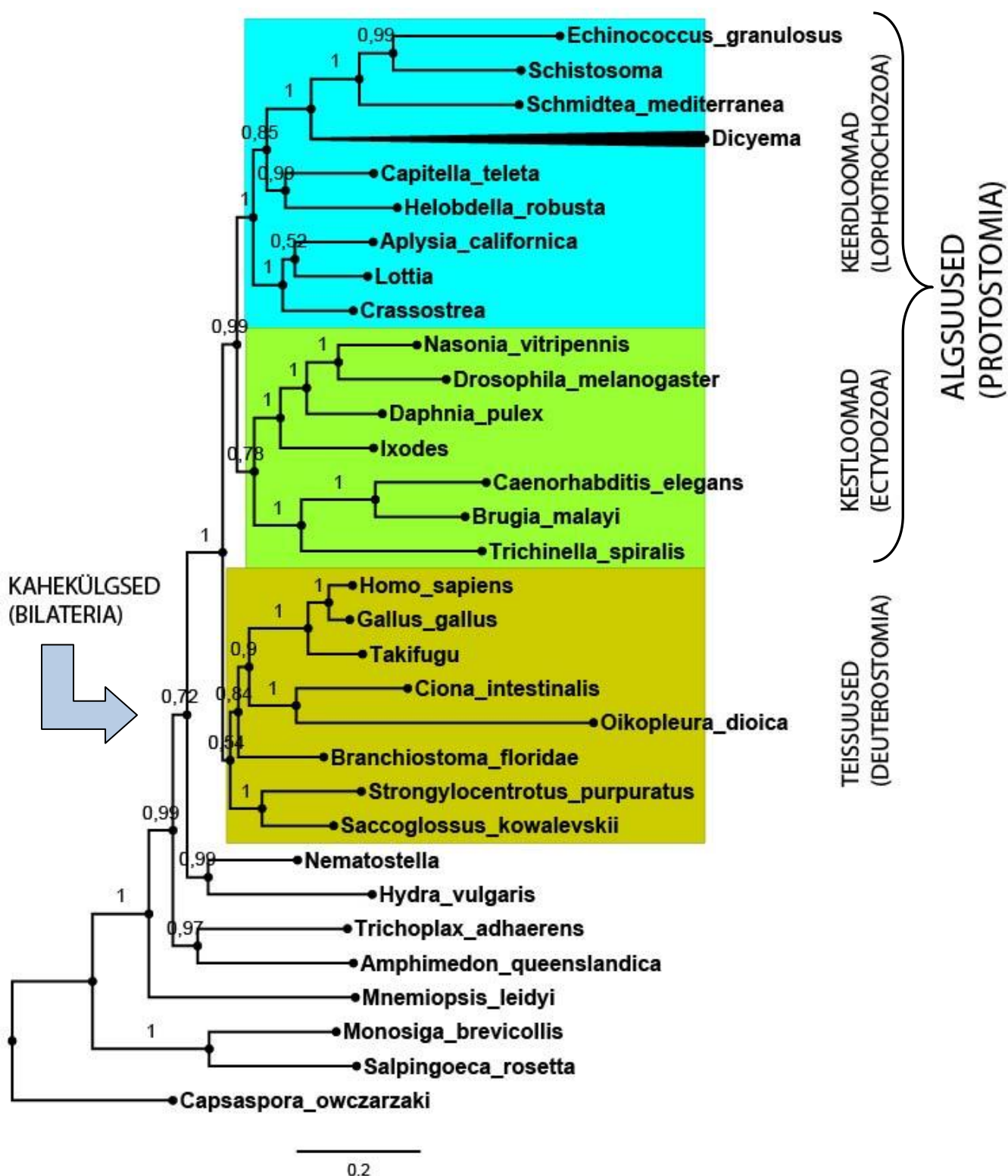
Näitamaks, kas vilasktomploomade üksmeelne paigutumine fülogeneesipuudes võib olla pika haru külgetõmbest (*Long branch attraction*, LBA) tingitud artefakt, teostati analüüsid ka liitmaatriksitega, kuhu olid koondatud mittemitokondri geenid kõigist taksonitest välja arvatud ümar – ja lameussid, kelle lähedusse *Dicyema* erinevatel puudel paigutus (joonis 6). Antud rühmade puhul on varasemalt näidatud nende suhteliselt kiiret evolutsiooni, mis molekulaarsetes analüüsides tihti ei peegelda nimetatud rühmade üldtunnustatud paigutumist (Simakov *et al.* 2013). Seda kinnitasid ka käesolevas töös saadud tulemused, kus ümar – ja lameusside harud on kõikidel fülogrammidel ühed pikimad. Analüüsid teostati nii LG kui ka EXEHO asendusmaatrikseid kasutades. Nende tulemusel on vilasktomploomade lähimad sugulased fülogeneesipuu limused (*Mollusca*) ning rõngussid (*Annelida*), mis toetavad eelnevate analüüside tulemusi. Haru toetus vilasktomploomade ning lähimate sugulastega rõngusside rühmast erines aga vastavalt kasutatud meetodile. LG mudeli puhul oli see aLRT'd kasutades 0,79, kuid bootstrap'i väärtus üksnes 42 (joonis 6). EXEHO mudeli puhul on sama haru aLRT toetus 0,93 (vt. lisad), bootstrap'i väärtusi selle mudeli tarbeks ei arvatatud.



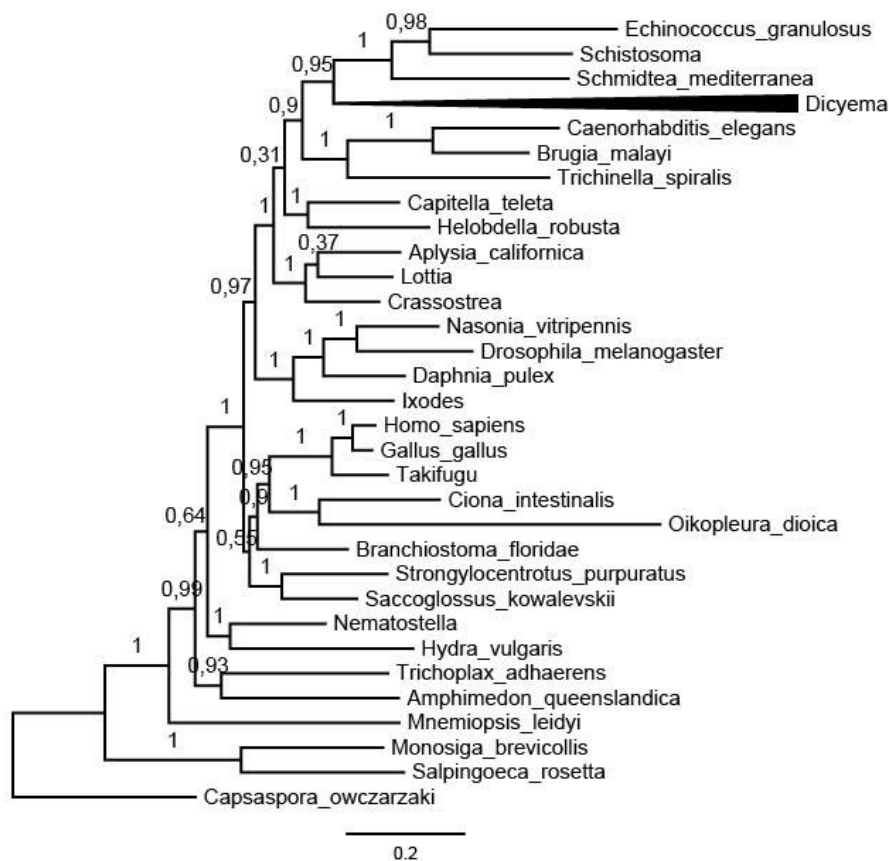
Joonis 2. – Fülogeneesipuu 32 taksoni kõigi 16 geeni põhjal, kasutades LG maatriksit. Puu harudel on nähtavad toetused on tõlgitavad kui aLRT / Bootstrap väärtus. Vilasktomploomade lähim sugulane selle puu põhjal on ameerika kammloom. Harudel, millel toetusi märgitud pole, olid need mõlemat testi kasutades maksimaalsed või erinesid sellest vähe.



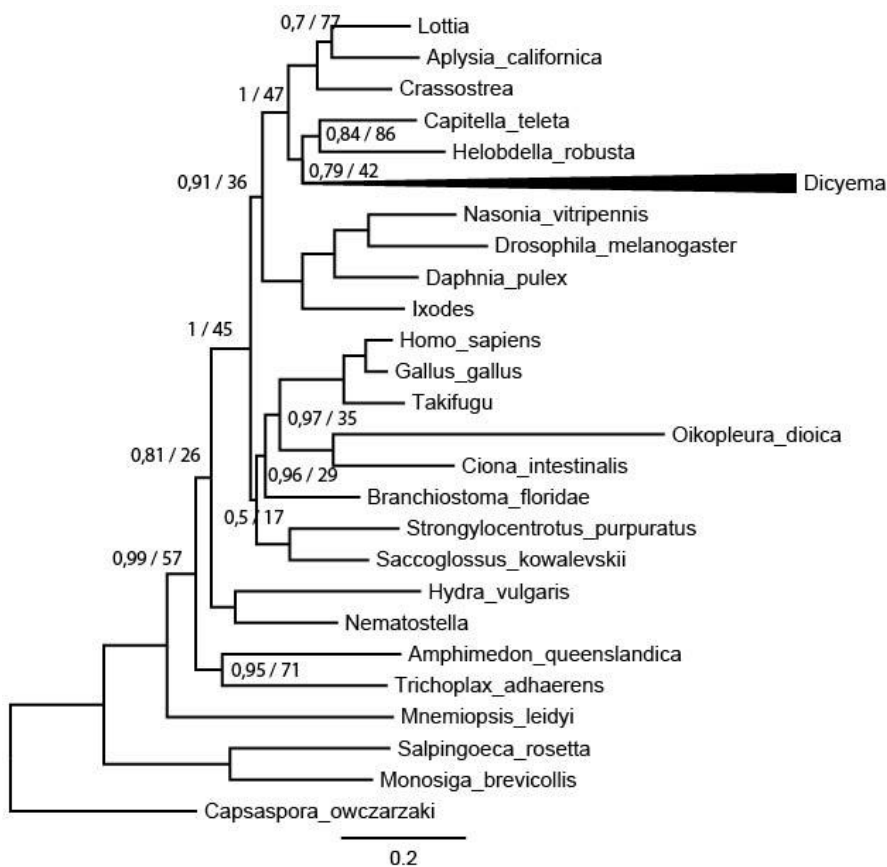
Joonis 3. – Fülogeneesipuu 32 taksoni mittemitokondri geenide (12) põhjal, LG mudeliga. Vilasktomploomade lähimad sugulased selle puu põhjal on lameussid (*Platyhelminthes*).



Joonis 4. – Fülogeneesipuu 32 taksoni 12 (mittemitokondri) geeni põhjal, LG4X mudeliga, mis andis praeguse üldtunnustatud loomade elupuuga kõige paremini kooskõlas olevad tulemused, allikaks eelkõige Halanych (2004). Ka selle puu põhjal on vilasktomploomade lähimateks sugulasteks lameussid.



Joonis 5. – Fülogeneesipuu 32 taksoni 12 (mittemitokondri) geeni põhjal, EXEHO segamudel. Vilaskomploomade lähimateks sugulasteks positioneeruvad lameussid.



Joonis 6. – Fülogeneesipuu 26 taksoni 12 (mittemitokondri) geeni põhjal, kust välja on arvatud ümarusside ja lameusside klad, kasutatud on LG mudelit. Vilaskomploomade lähimad sugulased on selle puu põhjal rõngussid.

5. Arutelu

Mõistatuslike vilasktomploomade fülogeneesi puudutavad hüpoteesid on seniste tööde põhjal jagunenud kahte lehte: tegemist on kas sekundaarselt taandarengu läbi teinud kahekülgsed, ilmselt keerdloomade (*Lophotrochozoa*) rühma kuuluvate organismidega (Katayama *et al.* 1995; Pawlowski *et al.* 1996; Furuya 2005; Ogino *et al.* 2010, Petrov *et al.* 2010) või ainuraksete protistide ja hulkraksete loomade vahevormiga, kõigi *Metazoa* hulka kuuluvate loomade sõsarrühmaga (Czaker 2000; Noto & Endoh 2004; Czaker 2011). Esimest varianti toetavad molekulaarsete andmetega teostatud fülogeneetilised analüüsid, teist aga morfoloogilised tunnused. Kõnealused loomad omavad mitmeid tunnuseid, mis on ühised protistidega, näiteks tavapärase ekstratsellulaarse maatriksi puudumine, torukujulised mitokondrite kristad, ripsmevõru, endotsütoosi võime, rakkudevaheline kommunikatsioon ilma mediaatoraineta (*cell-to-cell junctions*) ning selgesti eristuvad sugulise (rombogeense) ja mittesugulise (nematogeense) paljunemise faasid (Noto & Endoh 2004; Suzuki *et al.* 2010). Czaker on avaldanud põhjalikke uurimusi nii vilasktomploomade ekstratsellulaarse maatriksi (2000) kui ka spermatogeneesi kohta (2011), mille tulemustest lähtuvalt seab ta sügava kahtluse alla, et vilasktomploomad on evolutsioneerunud hulkraksest organismist ning degenereerunud parasitismi tulemusena. Ta vaidles sellele vastu, kuna pole tõestatud, et sünapomorfised pärishulkraksete (*Eumetazoa*), kelle hulka *Dicyema* geneetiliste analüüside põhjal kuulub, tunnused nagu ekstratsellulaarse maatriksi olemasolu või gastrulatsioon võiksid pelgalt parasitistliku eluviisi tõttu kaduda. Spermiide ultrastruktuuri ja spermatogeneesi uurides kirjeldas ta seda kui iidset evolutsioonilist mehhanismi, mille kujunemine ajapikku taandarengu tulemusena on vähetõenäoline (Czaker 2011). Tema uskus parema seletuse olevat Noto ja Endoh (2004) poolt välja pakutud nn kimäärihüpoteesi, mille järgi on vilasktomploomad protistid, kes on omandanud oma hulkraksete peremeeste geene horisontaalse geeniülekanne teel.

Käesolev töö võttis eesmärgiks koondada kokku kõik seni sekveneeritud vilasktomploomade (*Dicyema*) geenandmed ning valgujärjestusi kasutades rekonstrueerida nimetatud loomarühma fülogeneesipuu. Selleks koostati kõikide valkude geenipuud eraldi ning seejärel, peale kõige informatiivsemate geenid välja valimist, liideti need kokku ühisesse liitmaatriksisse, millega teostati suurima tõepära fülogeneetilised analüüsid erinevaid aminohapete asendusmaatrikseid kasutades – mõlemad meetodilised võtted on tunnustatud kui olulised ja tõepäraseid tulemusi andvad viisid fülogeneesi

rekonstrueerimiseks (Philippe *et al.* 2005a). Ajaliste ja arvutusvõimsuslike kaalutluste tõttu jäid tegemata analüüs CAT mudeliga (Lartillot & Philippe 2004) ning Bayes'i meetodil. CAT mudel on eelmistest veelgi spetsiifilisem ning seal määratakse kategooriate arv iga andmestiku põhjal eraldi. Bayes'i analüüs Markovi ahelate Monte Carlo meetodil on teine laialdaselt kasutatav alternatiiv suurima tõepära puude leidmiseks (Larget & Simon 1999).

Teostatud analüüsid andmestikuga, mis sisaldas endas mudelorganisme kokku 12 loomahõimkonnast ning kolme välisrühma liiki protistide seast, paigutasid vilasktomploomad üpris üksmeelselt kahekülgsete e. kolmelehtsete loomade (*Bilateria*) hulka ning täpsemini algsuuste (*Protostomia*) hulka. Kahekülgsete loomade alajaotus algsuused koondab üldtunnustatult endas omakorda kahte rühma - keerdloomad (*Lophotrochozoa*) ning kestloomad (*Ectydozoa*) (Halanych 2004; Dunn *et al.* 2008). Kõige enam kattus seni tunnustatud loomade elupuuga LG4X mudeliga teostatud analüüs (joonis 4), mis paigutas vilasktomploomad lameusside sõsarrühmaks, kusjuures puul joonistusi laias laastus välja ka teised Halanych'i poolt välja käidud taksonoomilised rühmad, st. keerdloomade rühmas on lameussid, rõngussid ja limused ning kestloomade seas lüljalgsed (*Arthropoda*) ja ümarussid (*Nematoda*), sealhulgas peaaegu kõikidel harudel on maksimumilähedased toetused. Teistel fülogrammidel muutus aga ümarusside positsioon, mis enamasti paigutus lameusside lähedusse (joonised 2, 3, ja 5) arvatavasti tänu pika haru külgetõmbe nähtusele.

Varasemast on teada, et lameussid (*Platyhelminthes*) ja ümarussid (*Nematoda*) evolutsioneeruvad ligikaudu kaks korda kiiremini kui lüljalgsed või teissuused (*Deuterostomia*) (Philippe *et al.* 2005b), kelle hulka kuuluvad näiteks okasnahksed ja keelikloomad. Sel põhjusel on need rühmad põhjustanud segadust ka varasemates loomade fülogeneesi molekulaarsetes uuringutes tänu pika haru külgetõmbele ning mitmeid geene kasutavad analüüsid on selle artefakti osas eriti tundlikud (Philippe *et al.* 2005b). Selle nähtuse vältimiseks teostatud analüüsid ilma nimetatud rühmade hulka kuuluvate taksoniteta aga märkimisväärseid erisusi ei toonud (joonis 6, lisad). Kui kõikide taksonitega analüüside puhul olid vilasktomploomade lähimateks sugulasteks enamasti just lame – ning ümarussid, siis suguluselt järgmisteks osutusid neil puhkudel rõngussid ja limused. Eemaldades liitmaatriksist kõige pikemaid harusid omanud taksonid – lameussid –, grupeerusid vilasktomploomad kokku pikkuselt järgmiste harude, ümarussidega (vt lisad). Kui aga mõlemad liitmaatriksist eemaldatud said, osutusid *Dicyema*'ga lähimas suguluses olevateks taksoniteks limused ja rõngussid (joonis 6). Üksnes viimasena mainitud tulemuse puhul võib üsna suure kindlusega välistada pika haru külgetõmbest

tulenenud artefakti. Järgmine äärmiselt kiirelt evolutsioneeruv liik, mantelloomade (*Tunicata*) esindaja *Oikopleura dioica* (Denoeud *et al.* 2010) fülogeneesipuude topoloogiat ilmselt suurel määral ei mõjutanud, kuna vaatamata oma pikale harule grupeerub see enamustes analüüsides teise mantellooma *Ciona intestinalis*'ega, välja arvatud juhul, kui liitmaatriksisse olid liidetud ka kiire evolutsiooniga (vt. ülal) mitokondri geenid (joonis 2).

Laias laastus toetasid käesolevas töös saadud tulemused eelpool nimetatud molekulaarsete andmetega tehtud analüüse ning geenandmed, praegusel juhul valgujärjestused, näivad jätkuvalt toetavad neid autoreid, näiteks Katayama jt. (1995), Winnepeninckx jt. (1998), Stunkard (1954) ning Kobayashi (2009), kes kõik pooldasid vilasktomploomade ekstreemse taandarengu hüpoteesi ning keeldusid uskumast, et nende lähimateks sugulasteks elupuus on protistid. Fülogrammi täpsema resolutsiooni tarbeks oleks tarvis teostada analüüs, mis sisaldaks arvukate algsuuste (*Protostomia*) hulka kuuluvate loomade genoomiandmeid, antud töö põhjal ei ole aga alust vilasktomploomade lähimate sugulasliikide kohta teoretiseerida. On võimalik, et *Dicyema* on lähemas suguluses hoopis rõngusside ja limuste, mitte lameussidega nagu näitas seda Suzuki jt. (2010) inneksiini valkude põhjal. Nimetatud autorid kasutasid oma töös mõnevõrra vähem taksoneid vähematest hõimkondadest, kuid teadaolevalt kiirelt evolutsioneeruvatest liikidest kasutatud kaks lameusside hõimkonda kuuluvat liiki selles uurimuses *Dicyema*'ga kokku ei klasterdunud. Edasist uurimist vajab küsimus, kas inneksiini valk võis tõepoolest peegeldada vilasktomploomade ja algsuuste hulka kuuluvate organismide põlvnemist, või kujutas nimetatud uurimus siiski vaid ühe geeni põlvnemissuhteid. Käesolevas töös ja siinse taksonite nimekirja puhul ei leitud inneksiini valk aga olevat hea marker, kuna geenipuu esines liiga palju eristamatuid paralooge, mistõttu seda geeni liitmaatriksisse ei kaasatud.

Olgugi, et siinsed liitmaatriksid sisaldasid välisrühma liikidest vaid kolme ainurakset protisti, ei viidanud ükski geenipuu ega ka lõplikud liigipuud vilasktomploomade paigutumisele puu juure lähedusse. Seetõttu ei leidnud toetust ka Noto ja Endoh' (2004) kimäärihüpotees, mis näeb ette *Dicyema* ainurakset päritolu. Nende autorite esitatud hüpotees peab jääma ootama uusi uurimustöid.

Käesolevas töös saadud tulemused vihjavad sellele, et vilasktomploomad, mereselgrootutes elutsevad siseparasiidid, on evolutsiooni tulemusena teinud läbi äärmusliku taandarengu, mis avaldub nende kehaehituses (kõigest kaks rakukihti), keharakkude arvus (10-40) ning kudede ja organite puuduses ning loomade süsteemis paiknevad nad kahekülgsel loomade seas vähemalt algsuuste klaadi, veelgi täpsem

kuuluvus jääb siinkohal ammendava vastuseta. Siiski jäävad alles küsimused lahkkelide kohta, mida ütlevad ühelt poolt nende parasiitide geenid ja teiselt poolt nende morfoloogia. Ilmselt saab kindlamaid hüpoteese selle loomarühma fülogeneesi kohta tõstatada alles pärast nende genoomi täielikku sekveneerimist.

Kokkuvõte

Kõigist teadusele tuntud loomahõimkondadest on vaheloomad (*Mesozoa*) ilmselt üks kõige enam küsimusi tekitavaid. Taksonoomiliselt kuuluvad sellesse rühma vilasktomploomade (*Dicyemida*) ja võõttomploomade (*Orthonectida*) klassid, kes kujutavad endast teadaolevalt ühe kõige lihtsama ehitusega, erinevates mereselgrootutes parasiteerivaid hulkrakseid organisme. Üks paljudest vastuseta küsimustest nende loomade kohta puudutab nende evolutsioonilist päritolu, kuna endiselt valitseb suur segadus selle osas, kes on nende parasiitide esivanemad – on siis nendeks ainuraksed protistid ning vaheloomad, nagu nende nimigi ütleb, on sillaks evolutsioonis ainurakselt ehitusplaanilt hulkraksele, või hoopis kahekülgsete (*Bilateria*) hulka kuuluvad loomad, kes on adaptiivselt kaotanud enamuse oma ehituslikust keerukusest ning taandarenenud kõigest mõnekümnest rakust koosnevatest, ilma elundite ja kudedeta olevusteks.

Oma magistritöös uurisin kõiki geenipanka (GenBank) üles laetud erinevaid *Dicyema* perekonna valgujärjestusi (74), kõigepealt ühekaupa ning seejärel ühte liitmaatriksisse koondatuna, et rekonstrueerida selle loomarühma põlvnemissuhteid. Välja said valitud 31 mudelorganismi mitmetest erinevatest loomahõimkondadest, kelle genoomide seast otsiti homolooge olemasolevatele vilasktomploomade valgujärjestustele. Iga geeni kohta koostati eraldi geenipuud, et tuvastada kuivõrd on eristatavad ortoloogsed – liigitekkeliselt informatiivsed – järjestused paraloogetest, misjärel valiti välja parimad geenid ning teostati suurima tõepära (ML) meetodeid kasutades fülogrammid nägemaks, missugusele positsoonile elupuus vilasktomploomad seni teadaolevate geenandmete põhjal paigutuvad.

Nagu ka mitmed eelnevad uurimused, näitasid ka minu magistritöös saadud tulemused, et ilmselt on vilasktomploomade näol tegemist algupäraselt kahekülgsete, ilmselt algsuuste (*Protostomia*) hulka kuuluvate organismidega, kelle lähimateks

sugulasteks on nähtavasti keerdloomad, mitte aga ainuraksed protistid. Erinevad fülogeneesimudeleid kasutades ja taksonite koosseisu ning geenide arvuga kombineerides jäid tulemused valdavalt üksmeelseteks. Samuti langes fülogrammide üldine topoloogia suures osas kokku praegusel hetkel üldtunnustatud loomade elupuu omaga.

Vilasktomploomade geeniandmed räägivad seega jätkuvalt seda keelt, et evolutsiooni tulemusena on võimalik läbida ja nende organismide näitel on ka läbitud äärmuslik degeneratsioon, mis ulatub raku struktuurideni välja. Näiteks on ekstratsellulaarse matriksi nende parasiitide puhul sedavõrd taandarenenud, et nende hulkrakne ehitusplaan ei kvalifitseeru enam isegi mitte koeks. Teisest küljest on aga morfoloogilised uuringud viidanud sellise stsenaariumi äärmisele ebatõenäosusele ning välja on käidud alternatiivse võimalusega, et parasiit on algupäraselt protist, kes on omandanud hulkraksete peremeesorganismide geene pigem bakterite seas levinud horisontaalse geeniülekanne teel. Käesolevas töös ei leitud aga ühelgi juhul, et vilasktomploomad platseerusid loomade elupuu juure lähedusse. Võimalik, et alles nende mõistatuslike loomade genoomi täielik sekveneerimine võib aidata lähemale selle vastuolu lahendamiseni.

Summary

Phylogeny of Dicyemid mesozoans

Of all the animal phyla known to science, the mesozoans remain one of the most perplexing and enigmatic. The phylum Mesozoa is comprised of two classes, *Orthonectida* and *Dicyemida*, both of whom are endoparasites of various marine invertebrates and represent one of the most primitive body plans of all multicellular animals. One of the numerous unanswered questions regarding these organisms is concerned with their phylogeny, because to this day it remains unknown who are the ancestors of these primitive creatures – whether they are unicellular protists, which would indicate, that mesozoans represent an evolutionary link between uni – and multicellular bodyplans, or they are higher animals, possibly from the Lophotrochozoan clade who have secondarily lost most of their structural features such as organs and organ systems up to the point, where even body tissues cannot be distinguished.

In my Master's thesis I investigated all of the available protein sequences of dicyemid mesozoans (74) from the GenBank database, separately at first and then by concatenating the most informative ones to a single supermatrix, which was then used to construct phylogenetic trees. Using the sequences of dicyemids as query sequences, searches from the genomes of 31 model species from various animal phyla were performed to find homologous protein sequences. Every gene was used to build a maximum likelihood gene tree, which were then inspected visually to assess the general topology of the trees and detect, whether orthologous sequences were distinguishable from the paralogues. Sixteen genes were found to be the most informative ones and they were concatenated to form a supermatrix, which was used to compute species trees using some of the best and most up-to-date models currently available.

The results seemed to corroborate those from studies made in the past. According to molecular data from genomes, the dicyemid mesozoans seem to belong to the bilaterian clade of animals, probably to the protostomes and their closest living relatives seem to be the Lophotrochozoans, but not unicellular protists. The results remained mostly consistent regardless of the evolutionary model or list of taxons that were used, with only minor

differences in the general topology of trees. Overall, the topology of trees was congruent with the tree of life, as it is known thus far.

Molecular data continues to tell the story, that the dicyemid mesozoans have most probably undergone an extreme degradation, from which even the organells of cells have not escaped. For example, the extracellular matrix of these creatures is structurally so primitive, that their bodyplan doesn't even qualify as a tissue. On the other hand, morphological studies from recent and more distant past have had serious doubts regarding such a scenario. According to some of them, it is more likely, that dicyemids are a result of an ancient unicellular animal having incorporated gene fragments from their multicellular hosts via lateral gene transfer, a hypothesis that didn't find any support from the analyses from the current study. It seems, that only the sequencing of the whole genome of the dicyemid mesozoans might provide a better insight to the phylogeny of these mysterious animals.

Tänuavaldused

Ennekõike soovin tänada oma juhendajat Marko Prousi, kes ei pidanud paljaks kulutada suurt hulka aega ja energiat minu juhendamiseks ja lõputuna näivatele küsimustele vastamiseks ning tänu kellele see töö ilmavalgust näeb. Samuti tänan Toomas Tammaru abistavate soovitude eest. Nimetamata ei saa jätta ka mõndasid lähedaseid inimesi ning Tiina Kaldat, kelle tugi osutus teatud hetkedel hädavajalikuks.

Kasutatud materjalid

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Andersson J.O., Sjogren A.M., Davis L.A.M., Embley T.M. & Roger A.J. (2003). Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes. *Current Biology*, 13, 94-104.
- Anisimova M. & Gascuel O. (2006). Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Systematic Biology*, 55, 539-552.
- Brown W.M., George M. & Wilson A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 1967-1971.
- Brusca R.C. & Brusca G.J. (2003). *Invertebrates. Second edition*.
- Czaker R. (2000). Extracellular matrix (ECM) components in a very primitive multicellular animal, the dicyemid mesozoan *Kantharella antarctica*. *Anatomical Record*, 259, 52-59.
- Czaker R. (2011). Dicyemid's dilemma: structure versus genes. The unorthodox structure of dicyemid reproduction. *Cell Tissue Res*, 343, 649-658.
- Dellaporta S.L., Xu A., Sagasser S., Jakob W., Moreno M.A., Buss L.W. & Schierwater B. (2006). Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports Placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8751-8756.
- Denoeud F., Henriot S., Mungpakdee S., Aury J.-M., Da Silva C., Brinkmann H., Mikhaleva J., Olsen L.C., Jubin C., Canestro C., Bouquet J.-M., Danks G., Poulain J., Campsteijn C., Adamski M., Cross I., Yadetie F., Muffato M., Louis A., Butcher S., Tsagkogeorga G., Konrad A., Singh S., Jensen M.F., Cong E.H., Eikeseth-Otteraa H., Noel B., Anthouard V., Porcel B.M., Kachouri-Lafond R., Nishino A., Ugolini M., Chourrout P., Nishida H., Aasland R., Huzurbazar S., Westhof E., Delsuc F., Lehrach H., Reinhardt R., Weissenbach J., Roy S.W., Artiguenave F., Postlethwait J.H., Manak J.R., Thompson E.M., Jaillon O., Du Pasquier L., Boudinot P., Liberles D.A., Volff J.-N., Philippe H., Lenhard B., Crollius H.R., Wincker P. & Chourrout D. (2010). Plasticity of Animal Genome Architecture Unmasked by Rapid Evolution of a Pelagic Tunicate. *Science*, 330, 1381-1385.
- Dunn C.W., Hejnal A., Matus D.Q., Pang K., Browne W.E., Smith S.A., Seaver E., Rouse G.W., Obst M., Edgecombe G.D., Sorensen M.V., Haddock S.H.D., Schmidt-Rhaesa A., Okusu A., Kristensen R.M., Wheeler W.C., Martindale M.Q. & Giribet G. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452, 745-U5.
- Furuya H. (2005). Phylogeny of dicyemid mesozoans: Possible metazoan origin. *Zoological Science*, 22, 1411-1411.
- Furuya H., Hochberg F.G. & Tsuneki K. (2001). Developmental patterns and cell lineages of vermiform embryos in dicyemid mesozoans. *Biological Bulletin*, 201, 405-416.
- Furuya H., Hochberg F.G. & Tsuneki K. (2003). Calotte morphology in the phylum Dicyemida: niche separation and convergence. *Journal of Zoology*, 259, 361-373.
- Furuya H. & Tsuneki K. (2003). Biology of dicyemid mesozoans. *Zoolog Sci*, 20, 519 - 532.
- Furuya H., Tsuneki K. & Koshida Y. (1996). The cell lineages of two types of embryo and a hermaphroditic gonad in dicyemid mesozoans. *Dev Growth Differ*, 38, 453 - 463.

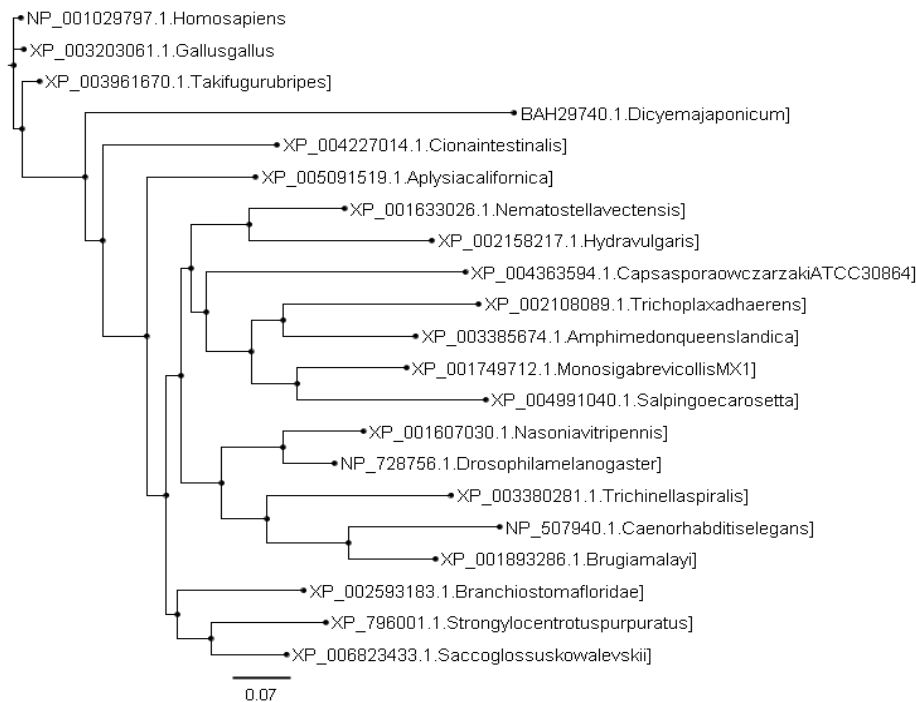
- Furuya H., Tsuneki K. & Koshida Y. (1997). Fine structure of dicyemid mesozoans, with special reference to cell junctions. *Journal of Morphology*, 231, 297-305.
- Golubchik T., Wise M.J., Easteal S. & Jermin L.S. (2007). Mind the Gaps: Evidence of Bias in Estimates of Multiple Sequence Alignments. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 2433-2442.
- Gu X., Fu Y.X. & Li W.H. (1995). Maximum-likelihood-estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 546-557.
- Guindon S. & Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Halanych K. (1991). 5S Ribosomal RNA Sequences Inappropriate for Phylogenetic Reconstruction. *Molecular Biology and Evolution*, 8, 249.
- Halanych K.M. (2004). The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 35, 229-256.
- Hanelt B., Van Schyndel D., Adema C.M., Lewis L.A. & Loker E.S. (1996). The phylogenetic position of Rhopalura ophiocoma (Orthonectida) based on 18S ribosomal DNA sequence analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 1187-1191.
- Katayama T., Wada H., Furuya H., Satoh N. & Yamamoto M. (1995). Phylogenetic position of the dicyemid mesozoa inferred from 18S rDNA sequences. *Biol Bull*, 189, 81 - 90.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K. & Miyata T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30, 3059-3066.
- Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J. & McInerney J.O. (2006). Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *Bmc Evolutionary Biology*, 6.
- Kobayashi M., Furuya H. & Holland P. (1999). Dicyemids are higher animals. *Nature*, 401, 762.
- Kobayashi M., Furuya H. & Wada H. (2009). Molecular markers comparing the extremely simple body plan of dicyemids to that of lophotrochozoans: insight from the expression patterns of Hox, Otx, and brachyury. *Evolution & Development*, 11, 582-589.
- Kueck P. & Meusemann K. (2010). FASconCAT: Convenient handling of data matrices. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 1115-1118.
- Larget B. & Simon D. (1999). Markov Chain Monte Carlo Algorithms for the Bayesian Analysis of Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 750.
- Lartillot N. & Philippe H. (2004). A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 1095-1109.
- Lasek-Nesselquist E. & Gogarten J.P. (2013). The effects of model choice and mitigating bias on the ribosomal tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 17-38.
- Le S.Q., Cuong Cao D. & Gascuel O. (2012). Modeling Protein Evolution with Several Amino Acid Replacement Matrices Depending on Site Rates. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 2921-2936.
- Le S.Q. & Gascuel O. (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1307-1320.

- Le S.Q. & Gascuel O. (2010). Accounting for Solvent Accessibility and Secondary Structure in Protein Phylogenetics Is Clearly Beneficial. *Systematic Biology*, 59, 277-287.
- Le S.Q., Lartillot N. & Gascuel O. (2008). Phylogenetic mixture models for proteins. *Royal Society Philosophical Transactions Biological Sciences*, 363, 3965-3976.
- Lemey P. (2009). *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing Second Edition Preface*.
- Maddison W.P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46, 523-536.
- Minelli A. (2009). *Perspectives in animal phylogeny and evolution*.
- Nielsen C. (2001). *Animal evolution: interrelationships of the living phyla. Second edition*.
- Noto T. & Endoh H. (2004). A "chimera" theory on the origin of dicyemid mesozoans: evolution driven by frequent lateral gene transfer from host to parasite. *Biosystems*, 73, 73-83.
- Ogino K., Tsuneki K. & Furuya H. (2007). The expression of tubulin and tektin genes in dicyemid mesozoans (phylum: Dicyemida). *Journal of Parasitology*, 93, 608-618.
- Ogino K., Tsuneki K. & Furuya H. (2010). Unique genome of dicyemid mesozoan: Highly shortened spliceosomal introns in conservative exon/intron structure. *Gene*, 449, 70-76.
- Ohama T., Kumazaki T., Hori H. & Osawa S. (1984). Evolution of multicellular animals as deduced from 5S ribosomal-RNA sequences - a possible early emergence of the Mesozoa. *Nucleic Acids Research*, 12, 5101-5108.
- Pawlowski J., MontoyaBurgos J.I., Fahrni J.F., Wuest J. & Zaninetti L. (1996). Origin of the Mesozoa inferred from 18S rRNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 1128-1132.
- Petrov N.B., Aleshin V.V., Pegova A.N., Ophitserov M.V. & Slyusarev G.S. (2010). New insight into phylogeny of Mesozoa: evidence from 18 and 28S rRNA genes. *Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya XVI Biologiya*, 4, 42-45.
- Philippe H., Delsuc F., Brinkmann H. & Lartillot N. (2005a). Phylogenomics. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 541-562.
- Philippe H., Lartillot N. & Brinkmann H. (2005b). Multigene Analyses of Bilaterian Animals Corroborate the Monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1246-1253.
- Rannala B. & Yang Z. (2008). Phylogenetic Inference Using Whole Genomes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 217-231.
- Ryan J.F., Pang K., Schnitzler C.E., Anh-Dao N., Moreland R.T., Simmons D.K., Koch B.J., Francis W.R., Havlak P., Smith S.A., Putnam N.H., Haddock S.H.D., Dunn C.W., Wolfsberg T.G., Mullikin J.C., Martindale M.Q., Baxevanis A.D. & Progra N.C.S. (2013). The Genome of the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and Its Implications for Cell Type Evolution. *Science*, 342, 1336-+.
- Simakov O., Marletaz F., Cho S.-J., Edsinger-Gonzales E., Havlak P., Hellsten U., Kuo D.-H., Larsson T., Lv J., Arendt D., Savage R., Osoegawa K., de Jong P., Grimwood J., Chapman J.A., Shapiro H., Aerts A., Otilar R.P., Terry A.Y., Boore J.L., Grigoriev I.V., Lindberg D.R., Seaver E.C., Weisblat D.A., Putnam N.H. & Rokhsar D.S. (2013). Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature*, 493, 526-531.
- Slyusarev G.S. (2000). Fine structure and development of the cuticle of *Intoshia variabili* (Orthonectida). *Acta Zoologica*, 81, 1-8.
- Slyusarev G.S. (2003). The fine structure of the muscle system in the female of the orthonectid *Intoshia variabili* (Orthonectida). *Acta Zoologica*, 84, 107-111.

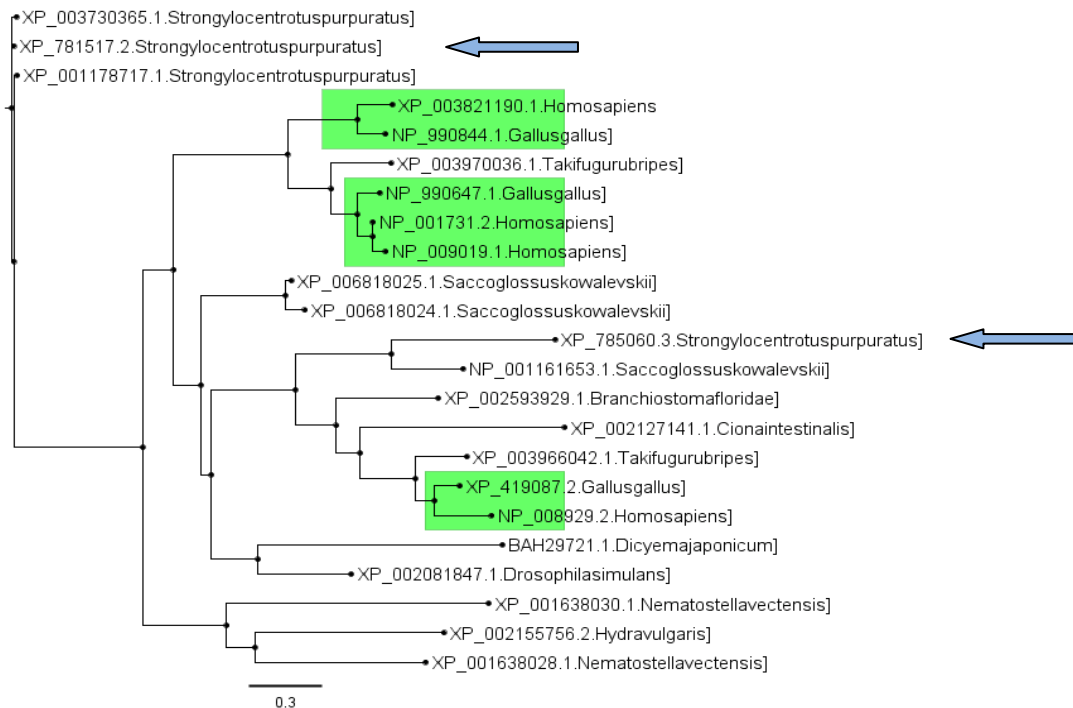
- Slyusarev G.S. & Kristensen R.M. (2003). Fine structure of the ciliated cells and ciliary rootlets of *Intoshia variabilis* (Orthonectida). *Zoomorphology*, 122, 33-39.
- Slyusarev G.S. & Miller D.M. (1998). Fine structure of the mature Plasmodium of *Intoshia variabilis* (Phylum Orthonectida), a parasite of the platyhelminth *Macrorhynchus crocea*. *Acta Zoologica*, 79, 319-327.
- Stunkard H.W. (1954). The life-history and systematic relations of the Mcsozoa. *Quarterly Review of Biology*, 29, 230-244.
- Suga H., Chen Z., de Mendoza A., Sebe-Pedros A., Brown M.W., Kramer E., Carr M., Kerner P., Vervoort M., Sanchez-Pons N., Torruella G., Derelle R., Manning G., Lang B.F., Russ C., Haas B.J., Roger A.J., Nusbaum C. & Ruiz-Trillo I. (2013). The Capsaspora genome reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nature Communications*, 4.
- Suzuki T.G., Ogino K., Tsuneki K. & Furuya H. (2010). Phylogenetic analysis of dicyemid mesozoans (phylum Dicyemida) from innexin amino acid sequences: dicyemids are not related to Platyhelminthes. *Journal of Parasitology*, 96, 614-625.
- Zardoya R. & Meyer A. (1996). Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 933-942.
- Zrzavy J. (2001). The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum- and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses. *Folia Parasitologica*, 48, 81-103.
- Talavera G. & Castresana J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56, 564-577.
- Whelan S. & Goldman N. (2001). A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 691-699.
- Winnepenninckx B.M.H., Van De Peer Y. & Backeljau T. (1998). Metazoan Relationships on the Basis of 18S rRNA Sequences: A Few Years Later.... *American Zoologist*, 38, 888-906.
- Yang Z.H. (1993). Maximum-likelihood-estimation of phylogeny from DNA-sequences when substitution rates differ over sites. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 1396-1401.
- Yang Z.H. (1994). Maximum-likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites - approximate methods. *Journal of Molecular Evolution*, 39, 306-314.
- Yang Z.H., Nielsen R. & Hasegawa M. (1998). Models of amino acid substitution and applications to mitochondrial protein evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 1600-1611.

LISAD

Lisa 1. – Näiteid esmastest geenipuudest.

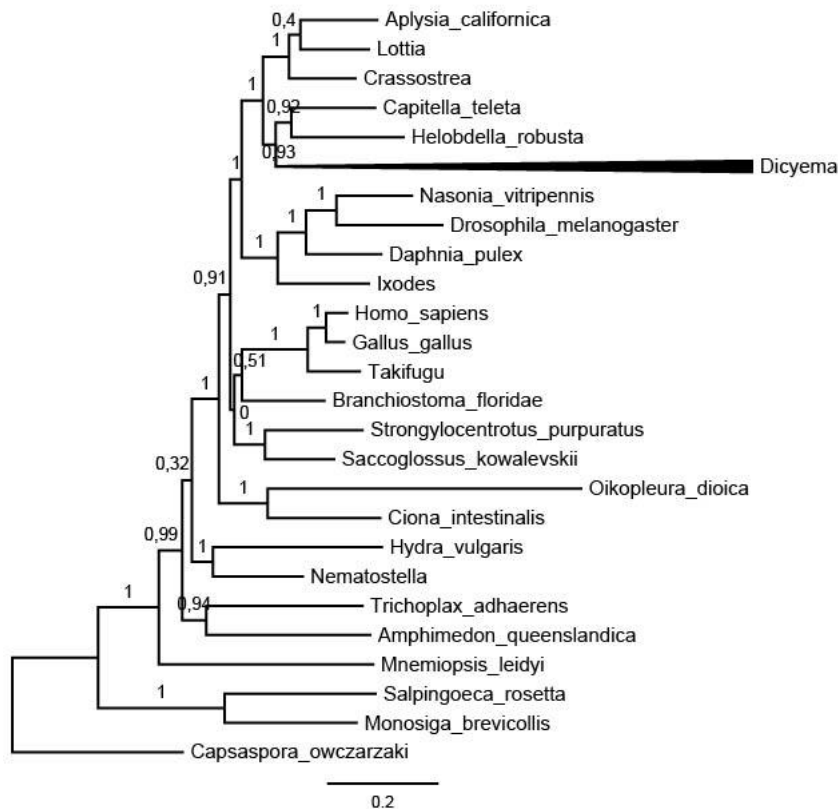


Pildil on näha *Dicyema japonicum*’i 60S ribosomaalse L8 valgu (BAH29740.1) esmane geenipuu peale homologide otsimist REFSEQ andmebaasist. Paralooe ei esine ning mitmed teadaolevalt monofüleetilised liigid klasterduvad kokku – märk heast geenist.

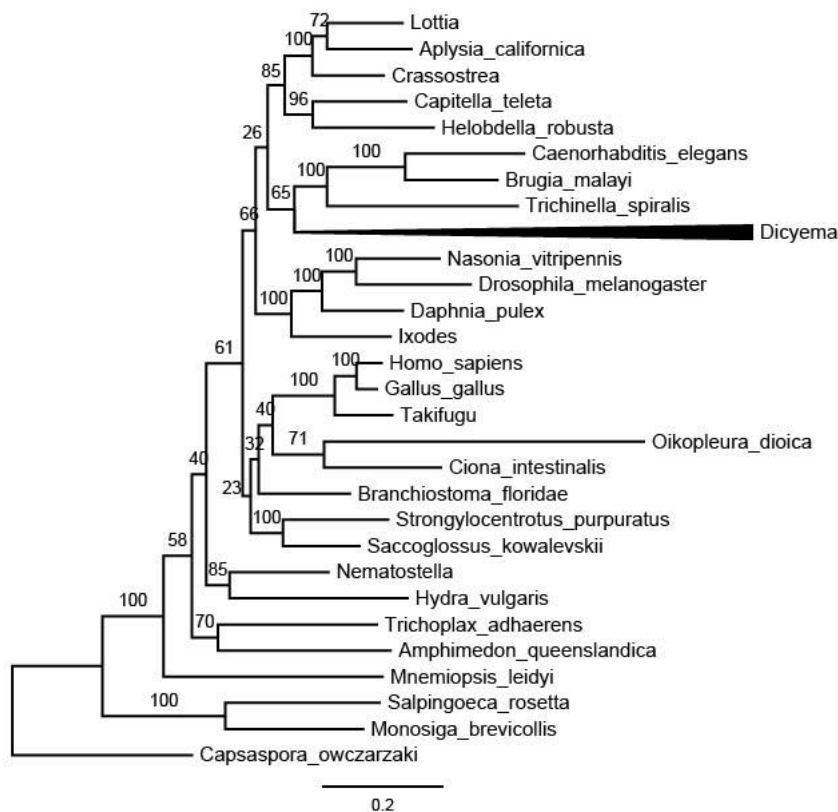


Käesolev pilt kajastab *Dicyema japonicum*’i valgu viitenumbriga BAH29721.1 (*calcium binding protein*). Taksonite esindatus otsingu põhjal oli väike ning geenipuu esineb mitmeid paralooe, rohelisel taustal on märgitud inimese ja kana paralooesed järjestused ning nooltega merisiiliku (*Strongylocentrotus purpuratus*) omad.

Lisa 2. – Tulemuste peatükist välja jäänud fülogrammid.



Fülogeneesipuu 12 mitte-mitokondri geeni põhjal, kasutades EXEHO mudelit. Välja on arvatud kiiresti evolutsioneeruvad lame- ja ümarussid. Harudel märgitud aLRT toetused.



Fülogeneesipuu 12 mitte-mitokondri geeni põhjal, kasutades LG mudelit. Välja on arvatud üksnes kolm lameusside liiki, harudel on märgitud Bootstrap toetused.

Lisa 3. – Analüüsid kasutatud valgud koos viitenumbritega andmebaasidest.

	26S proteasoomi subühik ATPaas 3	60 kDa kuumašoki valk	60S ribosomaalne valk L8	ATP süntaasi B- alaühik	<i>Branched chain ketoacid</i>	Tsütokroom C oksüdaas alaühik 1	Tsütokroom C oksüdaas alaühik 2	Tsütokroom C oksüdaas alaühik 3
Dicyema	BAH29735.1	BAH29731.1	BAH29740.1	BAF51688.1	BAH29719.1	BAA76310.1	BAA76311.1	BAA76312.1
Homo sapiens	NP_002795.2	NP_002147.2	NP_150644.1	NP_001677.2	NP_000047.1	YP_003024028.1	YP_003024029.1	YP_003024032.1
Gallus gallus	NP_001026361.1	NP_001012934.1	NP_001264657.1	NP_001026562.2	NP_989988.1	NP_006917.1	YP_272062.1	YP_272065.1
Takifugu rubripes	XP_005804269.1	XP_003961681.1	XP_003961670.1	XP_003966558.1	XP_003965942.1	NP_694917.1	NP_694918.1	YP_002333212.1 ⁴
Branchiostoma floridae	XP_002607322.1	XP_002595084.1	XP_002593183.1	XP_002595117.1	XP_002604318.1	NP_007757.1	NP_007758.1	NP_007761.1
Ciona intestinalis	XP_002126380.1	XP_002132071.2	XP_004227014.1	XP_002128220.1	XP_002128112.1	NP_758778.1	NP_758771.1	NP_758774.1
Oikopleura dioica	CBY20680.1	CBY33554.1	CBY20665.1	CBY23188.1	CBY33572.1	-	-	-
Strongylocentrotus purpuratus	XP_782191.3	XP_795205.2	XP_796001.1	NP_001116974.1	XP_796781.3	NP_006967.1	NP_006969.1	NP_006972.1
Saccoglossus kowalevskii	XP_002737235.1	XP_006811178.1	XP_006823433.1	NP_001171729.1	XP_002741809.2	YP_337795.1	YP_337796.1	YP_337786.1
Drosophila melanogaster	XP_002104596.1	NP_511115.2	NP_524726.1	NP_001259081.1	NP_001015354.3	NP_008278.1	NP_008279.1	NP_008282.1
Nasonia vitripennis	XP_001604886.1	XP_001600045.1	XP_001607030.1	NP_001153366.1	XP_001603426.2	ACH81747.1	XP_003427773.1	ACH81732.1
Daphnia pulex	EST	EFX84424.1	EFX70296.1	EFX90019.1	EFX69339.1	NP_008622.1	NP_008623.1	NP_008626.1
Ixodes scapularis	EST	XP_002433722.1	EST	XP_002413810.1	XP_002436268.1	ADO64507.1	EEC02091.1	BAD27246.1 ⁵
Caenorhabditis elegans	NP_491672.1	NP_497429.1	NP_507940.1	NP_498111.2	NP_492149.1	NP_006961.1	NP_006962.1	NP_006959.1
Trichinella spiralis	XP_003381696.1	XP_003371438.1	XP_003380281.1	XP_003377089.1	XP_003372209.1	NP_077265.1	NP_077266.1	NP_077262.1
Brugia malayi	XP_001893780.1	XP_001893759.1 + XP_001902773.1	XP_001893286.1	XP_001900654.1	XP_001902756.1	NP_694905.1	NP_694912.1	NP_694908.1
Aplysia californica	XP_005101113.1	XP_005097387.1	XP_005091519.1	XP_005107892.1	EST	YP_003687.1	YP_003693.1	YP_003698.2
Lottia gigantea	ESO86711.1	ESP04304.1	ESO98792.1	ESO97145.1	ESO93244.1	ABC00929.1 ¹	ABC00931.1 ¹	
Crassostrea gigas	EKC24037.1	EKC31862.1	EST	EKC39411.1	EKC31869.1	NP_037555.1	YP_002860225.1 ³	NP_037544.2
Capitella teleta	ELU02365.1	ELU10444.1	ELU14121.1	ELU15461.1	ELT94594.1]	ELU09662.1	ELU14412.1	
Helobdella robusta	ESO12444.1	ESN93528.1	ESO04213.1	ESO04728.1	ESO07175.1	AAF31686.1	AAF31687.1	AAF31689.1
Schistosoma japonicum	CAX69992.1	AAW24883.1 + CAX83020.1	CAX83044.1	CAX75390.1	-	NP_066203.3	NP_066204.2	-
Echinococcus granulosus	EUB62119.1	EUB62115.1	CDJ22587.1	CDJ15820.1	-	YP_626540.1	AAK51686.1	-
Schmidtea mediterranea	-	EST	EST	EST	-	YP_008592428.1	YP_008592434.1	YP_008592431.1
Nematostella vectensis	XP_001629565.1	XP_001641093.1	XP_001633026.1	XP_001626437.1	XP_001621337.1	ABG02350.1 ²	ABG02345.1 ²	ACY92285.1
Hydra vulgaris	XP_002164973.2	XP_002162506.2	XP_002158217.1	XP_002156597.1	XP_002154798.2	YP_002221538.1	YP_002221526.1	YP_002221529.1
Trichoplax adhaerens	XP_002108727.1	XP_002110795.1	XP_002108089.1	-	XP_002112870.1	YP_654082.2	YP_654096.1	YP_654092.1
Amphimedon queenslandica	XP_003386739.1	XP_003386088.1	XP_003385674.1	XP_003383663.1	-	YP_001031199.1	YP_001031203.1	YP_001031206.1
Mnemiopsis leidyi	ML45833a	ML14595a	ML148534a	ML14779a	-	YP_004927433.1	YP_004927436.1	YP_004927434.1
Monosiga brevicollis	XP_001749127.1	XP_001747265.1	XP_001749712.1	XP_001745468.1	XP_001743290.1	NP_696984.1	NP_696983.1	NP_696991.1
Salpingoeca rosetta	XP_004994078.1	XP_004989568.1	XP_004991040.1	XP_004998598.1	XP_004994095.1	-	-	-
Capsaspora owczarzaki	XP_004347471.1	XP_004348791.1	XP_004363594.1	XP_004364696.1	XP_004365509.1	AGE93633.1	AGE93599.1	AGE93637.1

¹ Lottia digitalis; ² Nematostella sp. JVK-2006; ³ Crassostrea sikamea; ⁴ Takifugu chinensis; ⁵ Ixodes uriae

	Ribosoomi valk L4	<i>solute carrier family 35 member B1</i>	<i>succinate-CoA ligase GDP forming alpha subunit</i>	Tektiin B	<i>F-actin capping protein beta</i>	Kuumašoki valk 90	NAD kinaas	NADH dehüdrogenaasi subühik I
Dicyema	BAH29739.1	BAH29743.1	BAH29745.1	BAF46877.1	BAH29715.1	BAJ09736.1	BAH29718.1	BAA89225.1
Homo sapiens	BAF84548.1	NP_005818.2	NP_003840.2	NP_055281.2	NP_001193469.1	NP_001017963.2	XP_006710900.1	YP_003024026.1
Gallus gallus	CAG32462.1	NP_989845.1	NP_001012910.1	XP_417774.3	NP_990768.1	CAA30251.1	NP_001026041.1	YP_272059.1
Takifugu rubripes	XP_003967498.1	XP_003964980.1	XP_003978749.1	XP_003969284.1	XP_003973272.1	XP_003971590.1	XP_003962996.1	YP_002333206.1 ⁴
Branchiostoma floridae	EEN48416.1	XP_002610890.1	XP_002610474.1	EEN47802.1	XP_002587386.1	EEN69500.1	XP_002590542.1	NP_007768.1
Ciona intestinalis	XP_002123535.1	XP_002125771.1	XP_002123295.1	BAB86299.1	NP_001265882.1	EST	XP_002131025.1	NP_758775.2
Oikopleura dioica	CBY22774.1	CBY35246.1	CBY13957.1	CBY34856.1	CBY20438.1	CBY42309.1	CBY14090.1	-
Strongylocentrotus purpuratus	XP_783473.1	XP_783979.2	XP_786544.2	AAA19672.1	XP_784706.3	XP_003725294.1	NP_001154910.1	NP_006965.1
Saccoglossus kowalevskii	XP_002731171.1	XP_006822267.1	XP_002738240.1	XP_002734332.1	XP_002737702.1	ADB22423.1	XP_002739588.2	YP_337794.1
Drosophila melanogaster	NP_524538.2	NP_001097853.1	NP_523905.2	AGB93680.1	NP_477005.1	AGB94057.1	NP_788345.1	NP_008289.1
Nasonia vitripennis	XP_001608023.1	XP_001602973.2	EST	XP_001599600.1	XP_001607231.2	XP_001601130.1	XP_003426645.1	ACH81724.1
Daphnia pulex	EFX90287.1	EFX80445.1	EFX76555.1	-	EFX79807.1	EFX66769.1	EFX83515.1	NP_008633.1
Ixodes scapularis	EEC09512.1	EST	XP_002399517.1	-	-	EEC18473.1	XP_002405188.1	XP_002408505.1
Caenorhabditis elegans	CCD61249.1	NP_499652.1	NP_510450.1	-	NP_496336.1	CAA99793.1	-	NP_006955.1
Trichinella spiralis	EFV57444.1	XP_003376491.1	EST	-	XP_003381811.1	EFV55915.1	-	NP_077267.1
Brugia malayi	EDP36835.1	XP_001893203.1	XP_001891596.1	-	-	EDP29326.1	-	NP_694910.1
Aplysia californica	XP_005092499.1	XP_005107108.1	XP_005089238.1	XP_005098540.1	XP_005109584.1	XP_005102885.1	XP_005110892.1	YP_003690.1
Lottia gigantea	ESO88181.1	ESO86832.1	ESO90357.1	ESO88252.1	ESO89924.1	ESO93506.1	ESO99523.1	ABC00940.1 ¹
Crassostrea gigas	EKC20167.1	EKC38822.1	EKC28150.1	EKC18085.1	-	EKC25687.1	EKC35723.1	NP_037553.2
Capitella teleta	ELT95434.1	ELT90500.1	ELU05339.1	ELU06439.1	ELU08402.1	ELU10916.1	ELU07131.1	EST
Helobdella robusta	ESO06800.1	ESN96954.1	ESN93286.1	ESN89890.1	ESN95613.1	ESN92065.1	ESO12411.1	AAF31683.1
Schistosoma japonicum	CAX76049.1	CAX73287.1	AAX27280.2	CAX73548.1	AAW24916.1	AAW27659.1	CCD75243.1	NP_066201.2
Echinococcus granulosus	CDJ16888.1	CDJ16512.1	EUB56696.1	EUB56753.1	CDJ16027.1	EUB54574.1	CDJ22539.1 + EUB60988.1.	YP_626538.1
Schmidtea mediterranea	EST	AFJ24854.1	EST	-	-	EST	EST	YP_008592433.1
Nematostella vectensis	EDO31005.1	XP_001641157.1	XP_001627384.1	EDO37357.1	XP_001636999.1	EDO48626.1	XP_001637014.1	ABG02342.1 ²
Hydra vulgaris	XP_002157151.1	XP_002164891.1	XP_002160938.2	XP_002158675.2	XP_002164225.1	XP_002165028.1	XP_002162934.2	YP_002221535.1
Trichoplax adhaerens	EDV24148.1	XP_002110189.1	XP_002117441.1	-	XP_002113373.1	EDV23651.1	XP_002113841.1	YP_654086.1
Amphimedon queenslandica	XP_003383564.1	XP_003387536.1	XP_003383961.1	XP_003384329.1	XP_003387876.1	XP_003385057.1	-	YP_001031200.1
Mnemiopsis leidyi	ML07395a	ML07399a	ML061710a	ML305512a	ML271531a	ML04011a	ML11533a	YP_004927441.1
Monosiga brevicollis	EDQ92202.1	XP_001748173.1	XP_001744918.1	-	XP_001748321.1	EDQ90925.1	XP_001749889.1	NP_696969.1
Salpingoeca rosetta	EGD72881.1	XP_004992370.1	XP_004995026.1	EGD81899.1	XP_004992296.1	EGD81432.1	XP_004997035.1	-
Capsaspora owczarzaki	EFW40343.1	-	XP_004347867.1	-	XP_004365828.1	EFW45590.1	XP_004347505.1	AGE93625.1

¹ Lottia digitalis; ² Nematostella sp. JVK-2006; ³ Crassostrea sikamea; ⁴ Takifugu chinensis; ⁵ Ixodes uriae

Lisa 4. – Taksonite ladinakeelsete nimede eestikeelsed vasted.

Dicyemida/Dicyema – vilasktomploomad

Homo sapiens – inimene

Gallus gallus – kana

Takifugu rubripes/Takifugu – pruun kaljuhammas, perek. kaljuhammas

Branchiostoma floridae – perek. süstikkala esindaja

Ciona intestinalis – meritupp hõimkonnast mantelloomad

Oikopleura dioica – hõimkonna mantelloomad teine esindaja, eestikeelne vaste puudub

Strongylocentrotus purpuratus – merisiilik

Saccoglossus kowalevskii – uss ürgkeelikloomade hõimkonnast, eestikeelne vaste puudub

Drosophila melanogaster – äädikakärbes

Nasonia vitripennis – kiletiivaliste seltsi, nukukireslaste sugukonda kuuluva perekonna esindaja

Daphnia pulex – vesikirp

Ixodes scapularis/Ixodes – puuk, perek. puuk

Caenorhabditis elegans – varbuss

Trichinella spiralis – seakeeritsuss

Brugia malayi – nematood, eestikeelne vaste puudub

Aplysia californica – merijänes (tigu)

Lottia gigantea/Lottia – meritigu

Crassostrea gigas/Crassostrea – suur hiidauster

Capitella teleta – hulkharjasuss hõimkonnast rõngussid

Helobdella robusta – kaan sugukonnast lamekaanlased

Schistosoma japonicum – vereimiuss

Echinococcus granulosus – põistang-paeluss

Schmidtea mediterranea – lameuss, eestikeelne vaste puudub

Nematostella vectensis/Nematostella – meriroos

Hydra vulgaris – hüdraloom

Trichoplax adhaerens – naastloom

Amphimedon queenslandica – eestikeelse vasteta käsn päriskäsnade klassist

Mnemiopsis leidyi – ameerika kammloom

Monosiga brevicollis, *Salpingoeca rosetta*, *Capsaspora owczarzaki* – protistid, eestikeelne vaste puudub

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Martin Pent

(sünnikuupäev: 01.12.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Vilasktomploomade (Dicyemida) fülogenees“,

mille juhendaja on Ph.D Marko Prous

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 26. mail 2014.